

**Rekonstitutions- und Funktionsanalyse neutrophiler Granulozyten
und unterschiedlicher Monozytensubpopulationen nach allogener
peripherer Blutstammzelltransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Maraike Tatjana Simone Rommeley, geb. Hanke
geboren am 25.01.1982
in Stuttgart

Gutachter:

1. PD Dr. med. S. Scholl, Jena
2. PD Dr. med. B. Gruhn, Jena
3. PD Dr. med. H. Ottinger, Essen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.06.2012

Meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten,
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC's	Antigen präsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
ATG	Antihymozytenglobulin
CALGB	Cancer and Leukemia Group B
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungscluster
CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha, Transkriptionsfaktor
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CR	Komplettremission
CSA	Ciclosporin A
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
d	Tag, day
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Eschericia coli
FACS	Fluorescence Analysing Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fMP	Formyl-Methionyl-Phenylalanin
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
G-CSF	Kolonie- stimulierender Faktor für Granulozyten
GvHD	Graft-versus-Host-Disease, Transplantat gegen Wirt Reaktion
HETE	hydroxyeicosatetranoic acid, 5-Hydroxyeicosatetraensäure
HLA	human leucocyte antigen, humanes Leukozytenantigen
ICAM	intracellular adhesion molecule, intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KMT	Knochenmarktransplantation

LECAM	leucocyte-endothelial cell adhesion molecule, leukozytäres Endothelzellen Adhäsionsmolekül
LTB-4	Leukotrien B-4
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MDS	myelodysplastisches Syndrom
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
miHAs	Minor-Histokompatibilitäts-Antigene
MMF	Mycophenolat Mofetil
MTX	Methotrexat
Mφ	aktivierter Makrophage
MRD	matched related donor, übereinstimmender Familienspender
MUD	matched unrelated donor, übereinstimmender Fremdspender
mMUD	mis-matched unrelated donor, nicht übereinstimmender Fremdspender
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzelle
PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
ROS	reactive oxygen species, Reaktive Sauerstoffspezies
RSV	respiratory syncytiale virus, Virus des Respirationstraktes
SAA	schwere aplastische Anämie
SSC	Sideways Scatter, Seitwärtsstreulicht
t	Translokation
TBI	total body irradiation, Ganzkörperbestrahlung
TGF-β	transforming growth factor beta, transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
VCAM	vascular cellular adhesion molecule, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VLA	very late antigen
VOD	veno-occlusive-disease, Venenverschlusskrankheit
VZV	Varizella-Zoster Virus

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	- 1 -
2	Einleitung.....	- 3 -
2.1	Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	- 3 -
2.1.1	Prinzipien und Indikationen der allogenen Stammzelltransplantation .	- 3 -
2.1.2	Ablauf einer Stammzelltransplantation am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie	- 3 -
2.2	Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation (angeborenes versus erworbenes Immunsystem).....	- 8 -
2.3	Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation	- 9 -
2.3.1	Entstehung der Transplantat–gegen–Wirt–Reaktion (GvHD).....	- 9 -
2.3.2	Infektiöse Komplikationen	- 14 -
2.4	Funktionelle Aspekte von Granulozyten und Monozyten	- 17 -
2.4.1	Chemotaxis und Migration	- 17 -
2.4.2	Phagozytose und „oxidativer Burst“	- 18 -
2.4.3	Monozytensubpopulationen	- 20 -
3	Ziele der Arbeit	- 22 -
4	Publizierte Originalarbeiten.....	- 24 -
4.1	Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation. Rommeley Maraike, Spies-Weisschart Baerbel, Schilling Kristina, Hochhaus Andreas, Sayer Herbert G., Scholl Sebastian; Journal of Cancer Research Clinical Oncology 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-011-0989-X.....	- 24 -
4.2	Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Scholl Sebastian, Hanke Maraike, Höffken Klaus, Sayer Herbert G.; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology; 133(6):411-415; 2007	- 25 -
5	Diskussion	- 26 -
6	Schlussfolgerung	- 34 -
7	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	- 35 -
8	Anhang.....	- 44 -
8.1	Danksagung.....	- 44 -

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung	- 45 -
8.3 Tabellarischer Lebenslauf	- 46 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CALGB-Klassifikation.....	- 4 -
Tabelle 2: Schweregradeinteilung der chronischen GvHD	- 13 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abwehrmechanismen des Immunsystems	- 8 -
Abbildung 2: Angriffspunkte für die Entstehung einer akuten GvHD	- 11 -

1 Zusammenfassung

Die allogene periphere Blutstammzelltransplantation (PBSCT) stellt eine wichtige Therapiemodalität für die Behandlung konventionell nicht heilbarer hämatopoetischer Grunderkrankungen dar. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rekonstitution des angeborenen Immunsystems nach allogener PBSCT. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur Migration und zur Ausführung eines „oxidativen Burst“ zwischen Tag +30 und +40 an 14 Patienten nach allogener PBSCT untersucht. Dazu wurden die kommerziellen Testkits Migratest® und Phagoburst® der Firma ORPEGEN Pharma (Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Es zeigten sich keine Unterschiede sowohl in der Migrationsfähigkeit ($p = 0,17$) neutrophiler Granulozyten als auch im Hinblick auf den „oxidativen Burst“ nach Stimulation mit fMLP ($p = 0,06$) und PMA ($p = 0,08$). Dagegen zeigte sich der „oxidative Burst“ nach Stimulation mit *E. coli* noch deutlich eingeschränkt ($p = 0,0001$).

Der Hauptteil der hier vorgestellten Arbeit beschäftigt sich mit der Funktionalität von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den ersten 100 Tagen nach allogener PBSCT. Dazu wurden nach erfolgreichem Engraftment neutrophile Granulozyten und Monozyten aus Vollblutproben von 30 Patienten (20-63 Jahre) an den Tagen +30, +60 und +90 nach allogener PBSCT untersucht. Es wurden die Testsysteme Phagotest® und Phagoburst® von ORPEGEN Pharma verwendet. Dabei wurden die Fähigkeit zur Phagozytose der neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach Stimulation mit *E. coli* sowie die Reaktivität dieser Zellgruppen mittels „oxidativem Burst“ nach Inkubation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP, dem Proteinkinase C-Liganden PMA und opsonierten *E. coli* mittels FACS-Analyse bestimmt. Zur immunologischen Abgrenzung der Monozyten erfolgte eine Antikörperfärbung der Proben gegen das Antigen CD14. Die neutrophilen Granulozyten wurden über ihre Scattereigenschaften zugeordnet.

Die Relativverteilung der CD14+CD16+ Monozyten wurde durch eine Erythrozytenlyse mit nachfolgender Antikörperfärbung (monoklonale Mausantikörper CD14-APC und CD16-PE) ermittelt. Die Berechnung der Absolutzahlen (CD14++CD16- versus CD14+CD16+ Monozyten) erfolgte unter zusätzlicher Berücksichtigung der Leukozytenzahlen aus dem Differenzialblutbild.

Zusätzlich wurde versucht, eine Korrelation zwischen dem Auftreten schwerer infektiöser Komplikationen und dem klinischen Erscheinungsbild mit absoluten Zellzahlen von CD14+CD16+ Monozyten herzustellen und auf einen Zusammenhang hin zu untersuchen.

Die Rekonstitution sowohl der neutrophilen Granulozyten als auch der Monozyten im Hinblick auf die Fähigkeit zur Phagozytose von *E. coli* ergab eine rasche Erholung ohne signifikante Zunahme zwischen Tag +30 und Tag +90. Schon an Tag +30 entsprachen die gemessenen Werte denen der gesunden Normalbevölkerung. Das bedeutet eine vollständige Erholung bis Tag +30 nach allogener PBSCT dieser Zellgruppen in Bezug auf ihre Phagozytosefähigkeit.

Dagegen ist die Fähigkeit bei Monozyten zum „oxidativen Burst“ nach Stimulation mit PMA an Tag +30 noch deutlich verringert und steigt bis Tag +60 signifikant an ($p = 0,017$). Nach Aufnahme von *E. coli* zeigten neutrophile Granulozyten an Tag +30 im Vergleich zu Tag +60 eine ebenfalls signifikant eingeschränkte Funktionalität bei der Durchführung des „oxidativen Burst“ ($p = 0,01$). Nach Inkubation mit fMLP hingegen zeigten beide Zellgruppen keine signifikanten Reaktionsunterschiede an den unterschiedlichen Messtagen.

Die quantitative Analyse der CD14+CD16+ Monozyten ergab ein deutlich höheres Verhältnis (Quotient) zur Population der klassischen CD14++ Monozyten als in der Literatur für die Normalbevölkerung beschrieben. Bei der Korrelation mit klinischen Daten konnte ein positiver Zusammenhang in Bezug auf hohe absolute Zellzahlen der CD14+CD16+ Monozyten und dem verminderten Auftreten einer chronischen Graft-versus-Host-Disease (GvHD) nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit demonstrieren eine frühe funktionelle Rekonstitution der Phagozytosefähigkeit von neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach allogener PBSCT. Bei der Fähigkeit zur Durchführung des „oxidativen Burst“ bedarf es je nach Zellpopulation und Stimulus mehr Zeit bis zur vollständigen funktionellen Erholung.

Zusätzlich deuten die Daten auf einen Zusammenhang zwischen den Absolutzahlen für CD14+CD16+ Monozyten und dem klinischen Auftreten einer chronischen GvHD hin.

2 Einleitung

2.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

2.1.1 Prinzipien und Indikationen der allogenen Stammzelltransplantation

Die allogene Stammzelltransplantation ist eine etablierte Therapiestrategie bei verschiedenen hämatologischen Systemerkrankungen, Immundefektsyndromen und angeborenen Stoffwechselerkrankungen. Die Indikationsstellung ist abhängig von der Grunderkrankung, vom Krankheitsverlauf, Krankheitsstadium, Alter des Patienten, Komorbidität, Organfunktion und psychischem Zustand des Patienten. Aktuelle individuelle Indikationsempfehlungen richten sich nach dem jeweiligen Kenntnisstand und dem Vorhandensein alternativer, Erfolg versprechender Therapiemöglichkeiten (Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen 1997; Michel 2005).

Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden dem Empfänger nach vorheriger Chemo- und / oder Strahlentherapie (Konditionierungstherapie) körperfremde Stammzellen transfundiert. Es handelt sich dabei entweder um Knochenmarkstammzellen (KMT) oder um Stammzellen aus dem peripheren Blut (PBSCT), die nach Gabe von Wachstumsfaktoren mobilisiert und danach mittels Apherese gewonnen werden. Eine dritte mögliche Stammzellquelle ist das Nabelschnurblut. Allerdings kommt diese Quelle bisher nur selten zum Einsatz (Mattson 2008).

2.1.2 Ablauf einer Stammzelltransplantation am Beispiel der akuten myeloischen Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist die Erkrankung mit der höchsten Rate an allogenen Transplantationen. Die Indikationsstellung erfolgt aufgrund Prognose bestimmender Risikofaktoren und individueller Patientencharakteristika. Von entscheidender Bedeutung sind das Erreichen bzw. das Nichterreichen einer kompletten Remission (CR = Normalisierung von Blutbild und Knochenmark mit weniger als 5% Blasten im Knochenmark) nach der ersten Induktionstherapie und die zytogenetische Analyse der leukämischen Blasten im Sinne einer

zytogenetischen Prognoseabschätzung. Die CALGB (Cancer and Leukemia Group B)-Klassifikation zur Prognoseabschätzung auf Grundlage wichtiger zytogenetischer Marker findet sich in Tabelle 1. Je nach Einordnung in die jeweilige Prognosegruppe erfolgt die weitere Therapieplanung. Wird der Patient in die günstige Prognosegruppe eingeordnet, erfolgt primär keine Transplantation. Patienten, die in die intermediäre Gruppe fallen werden nur bei Fehlen prognostisch günstiger molekulargenetischer Veränderungen (z.B. der NPM1 Mutation oder der CEBPA-Mutation) stammzelltransplantiert. Bei Patienten unter 65-70 Jahren mit schlechter zytogenetischer Prognose wird primär die Transplantation angestrebt (Grimwade et al. 1998).

Einteilung der Prognosegruppen nach der "Cancer and Leucemia Group B"

günstig	intermediär	schlecht
t(8;21)	normaler Karyotyp	inv(3)/t(3;3)
inv(16)/t(16;16)	-Y	t(6;9)
del(9q)	+8	t(6;11)
	t(9;11)	-7
	+11	komplexer Karyotyp
	+13	(≥ 3 Aberrationen)
	del(5q)	
	del(7q)	

Tabelle 1: CALGB-Klassifikation

Die 10-Jahresüberlebensrate nach allogener Stammzelltransplantationen in erster Remission liegt bei 60%. Bei einem späteren Transplantationszeitpunkt sinkt diese auf unter 30%. Ebenfalls höhere Letalitätszahlen weisen Transplantationen mit nichtverwandten Fremdspendern auf (Germin & Hagenström 2005). Die Spenderauswahl ist eine wichtige Entscheidung für die Langzeitprognose bzw. die Lebensqualität des Patienten nach der Transplantation.

Geeignete Spenderperson ist ein HLA-identischer Geschwisterspender (Core Family Donor Search). Die Chance hierfür liegt bei einem zu testenden Geschwister bei 25%. Bei Vorhandensein eines eineiigen Zwillings spricht man von einer syngeneten Transplantation. Die Wahrscheinlichkeit einen passenden Fremdspender zu finden, liegt bei ca. 80-85% (Germin & Hagenström 2005; Mattson 2008).

Bei einem Fremdspender sollte zusätzlich eine HLA-DR-Kompatibilität bestehen. Bei Fehlen eines HLA-identischen Fremdspenders kann in bestimmten klinischen Situationen (z.B. AML in zweiter Remission) auch eine Mismatch-Konstellation (z.B. ein Allel) toleriert werden. Soweit möglich werden noch weitere Faktoren wie z.B. das Geschlecht und das Alter des Spenders oder die Anzahl an Schwangerschaften bei der Spenderperson berücksichtigt. Ebenfalls wird auf eine Seronegativität für bestimmte Viren aus der Herpesgruppe geachtet (Lee et al. 2008). Ist auch diese Suche erfolglos, bleibt die Möglichkeit einer haploidenten Familienspende. Dieses Verfahren bedarf gesonderter Konditionierungsprotokolle. Eine T-Zell-Depletion ist notwendig und es ist auf höhere CD34-Zellzahlen im Transplantat zu achten (Mattson 2008).

Vor jeder Transplantation muss das Immunsystem des Patienten auf das Transplantat in Form einer Konditionierungstherapie vorbereitet werden. Die klassische Konditionierungstherapie kann aus einer intensiven Zytostatikatherapie mit zum Beispiel Cyclophosphamid (60 mg / kg an den Tagen -3 und -2) und vorausgehender kombinierter Ganzkörperbestrahlung (TBI = total body irradiation) mit gesamt ca. 12 Gray (fraktioniert zwischen Tag -7 und -4) bestehen. Bei unverwandtem Spender kann dieses Protokoll um Antithymozytenglobulin (ATG) ergänzt werden.

Abweichend kann eine dosisreduzierte Konditionierung z.B. nach Slavin, bestehend aus Fludarabin (30 mg / m² von Tag -10 bis -5), Busulfan (4 mg / kg an Tag -6 und -5) und ATG (10 mg / kg, an den Tagen -4 bis -1) durchgeführt werden (Slavin et al. 1998).

Die Konditionierungstherapie dient der Zerstörung verbliebener Tumorzellen sowie der Myelosuppression des Empfängers und damit der Unterdrückung dessen Immunsystems als Prophylaxe einer Transplantatabstoßung (Mattson 2008).

Dies ist die Voraussetzung für ein Anwachsen des Transplantates („Engraftment“). Art und Intensität der Konditionierungstherapie sind sowohl abhängig von Grunderkrankung, Remissionszustand, Alter und Komorbidität des Patienten als auch von möglichen Komplikationen im Rahmen vorangegangener konventioneller Chemotherapien.

Nebenwirkungen der Konditionierungstherapie sind in Früh- und Spättoxizität einzuteilen. Zur Frühtoxizität zählen z.B. Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall, Mukositis, Diarrhoe, hämorrhagische Zystitis, Kardiomyopathie und VOD (hepatische

Venenverschlusskrankheit mit Hepatomegalie, Ikterus, Aszites). Zur Spättoxizität gehören neben einer Gonadeninsuffizienz und Wachstumsstörungen bei Kindern auch das Risiko der Induktion sekundärer Malignome (Germing & Hagenström 2005).

Als Stammzellquelle dienen bei der allogenen Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen entweder periphere Blutstammzellen (PBSCT), Knochenmark (KMT) oder in seltenen Fällen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut (Bensinger WI et al. 1996). Welche Quelle genutzt wird, ist abhängig von der jeweiligen Indikationsstellung und der aktuellen Verfügbarkeit. Jeweils aktuelle Richtlinien hierzu finden sich bei der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (Ottinger et al. 2001) oder über das National Marrow Donor Program, USA (Hurley et al. 2003).

Bei der Knochenmarkspende werden durch mehrmalige Punktion der beiden Beckenkämme des Spenders in Vollnarkose 500-1200ml Knochenmarkblut entnommen. Dieses wird heparinisiert und die Anzahl der gewonnenen Stammzellen bestimmt. Erforderlich sind hierbei $2-4 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen / kg KG (Körpergewicht) des Empfängers. Schonender für den Spender ist die Stammzellentnahme bei der peripheren Blutstammzellspende. Hier erfolgt die Gewinnung mittels Leukapherese aus dem peripheren venösen Vollblut. Allerdings zirkuliert physiologisch nur eine geringe Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen im venösen Vollblut, so dass eine vorherige Stimulation des Spenders mit Wachstumsfaktoren wie G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) zur Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie nötig ist. Der Zielwert hierbei ist die Gewinnung ebenfalls von $2-4 \times 10^6$ CD34+ Stammzellen / kg KG des Empfängers (Michl 2005).

Die Stammzelltransplantation erfolgt frühestens 36 Stunden nach der letzten Chemotherapie. Beim Empfänger besteht in der Regel noch ca. zwei Wochen eine Panzytopenie mit völliger Immunsuppression. In dieser Zeit kommt es zum Anwachsen des Transplantats, dem so genannten Engraftment. Es zeigte sich ein deutlich schnelleres Anwachsen nach PBSCT (ca. Tag +12) als nach Transplantation von Knochenmark (ca. Tag +20). Diese Phase erfordert eine intensive Betreuung des Patienten mit einer umfassenden supportiven Therapie und Infektprophylaxe mittels Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten, Antibiotika, Virostatika und Antimykotika (Germing & Hagenström 2005).

Als erstes ist nach ca. zwei Wochen ein Anstieg von Monozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zu verzeichnen, gefolgt von steigenden Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen. Nur in Ausnahmefällen wie beispielsweise schweren infektiösen Komplikationen und im Rahmen klinischer Studien wird dieser Prozess durch die Gabe von Wachstumsfaktoren wie G-CSF verkürzt. Die frühere Annahme, durch Gabe dieser Medikamente die Gefahr einer Infektion zu verringern, musste der Vermutung weichen, dass die Gabe mit einer verminderten Immunreaktion und einer erhöhten Assoziation einer akuten GvHD (Graft-versus-Host-Disease) einhergeht. Daher wird aktuell die Gabe von G-CSF nach allogener PBSCT und KMT von der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) nur bei infektiösen Komplikationen oder verlängerter Neutropeniephase empfohlen (Appelbaum 2004; Dekker et al. 2006; Smith et al. 2006).

Nach allogener Stammzelltransplantation ist zunächst eine kontinuierliche medikamentöse Immunsuppression notwendig. Ausschlaggebend für das Ausmaß der immunsuppressiven Therapie sind die Herkunft des Transplantats und eventuelle HLA-Inkompatibilitäten (Familienspender vs. Fremdspender, Grad der HLA-Kompatibilität) (Kollman et al. 2001). Selten kommt es zu einer Abstoßung des Transplantats und somit zu fehlendem Anwachsen und Ausbleiben einer hämatopoetischen Rekonstitution (graft failure). Wesentlich häufiger und für die klinische Situation und Prognose des Patienten entscheidender ist das Auftreten einer immunologischen Reaktion des Transplantates gegen den Empfänger (GvHD). Eine kontinuierliche frühzeitige Immunsuppression zählt zu einem der wichtigsten Bausteine der Prophylaxe einer akuten und folglich einer chronischen GvHD (Toubai et al. 2008).

Das nach klassischer Konditionierung verwendete Therapieprotokoll besteht aus einer Kombination aus Ciclosporin A (CSA) und Methotrexat (MTX). CSA kann durch den Calcineurininhibitor Tacrolimus ersetzt werden, ohne dass ein entscheidender Unterschied in Überleben des Patienten oder Auftreten einer GvHD beobachtet werden kann. Mycophenolat Mofetil dient als Alternative oder additiv bei unverwandten Fremdspendern. Ebenfalls gute Resultate konnten in der Prophylaxe einer akuten GvHD bei der Kombination des Makrolids Sirolimus mit Tacrolimus nachgewiesen werden. Cutler et al. konnten auch bei Einsatz von Sirolimus anstelle von MTX ein schnelleres „Engraftment“ und ein geringeres Auftreten einer akuten GvHD nachweisen. ATG dient ebenfalls der Immunsuppression post

transplantationem. Wichtig ist hierbei ein ausreichender ATG-Spiegel zum Zeitpunkt der Transplantation (Sullivan et al.1991; Cutler et al. 2006; Mattson 2008).

2.2 Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation (angeborenes versus erworbenes Immunsystem)

Die angeborene Immunabwehr von pathogenen Keimen ist eine der ersten Abwehrmechanismen (Effektormechanismen), die 0-4 h nach einer Infektion greifen. Die Effektormechanismen der erworbenen Immunität beginnen erst nach 4-96 h zu wirken, vorausgesetzt dass voraktivierte Lymphozyten (B- und T-Zellen) vorhanden sind. Stehen solche nicht zur Verfügung beginnen die Abwehrmechanismen der erworbenen Immunität nach ca. 96 h. Siehe dazu nachfolgende Darstellung [vgl. Neumann, Immunbiologie, 2008]:

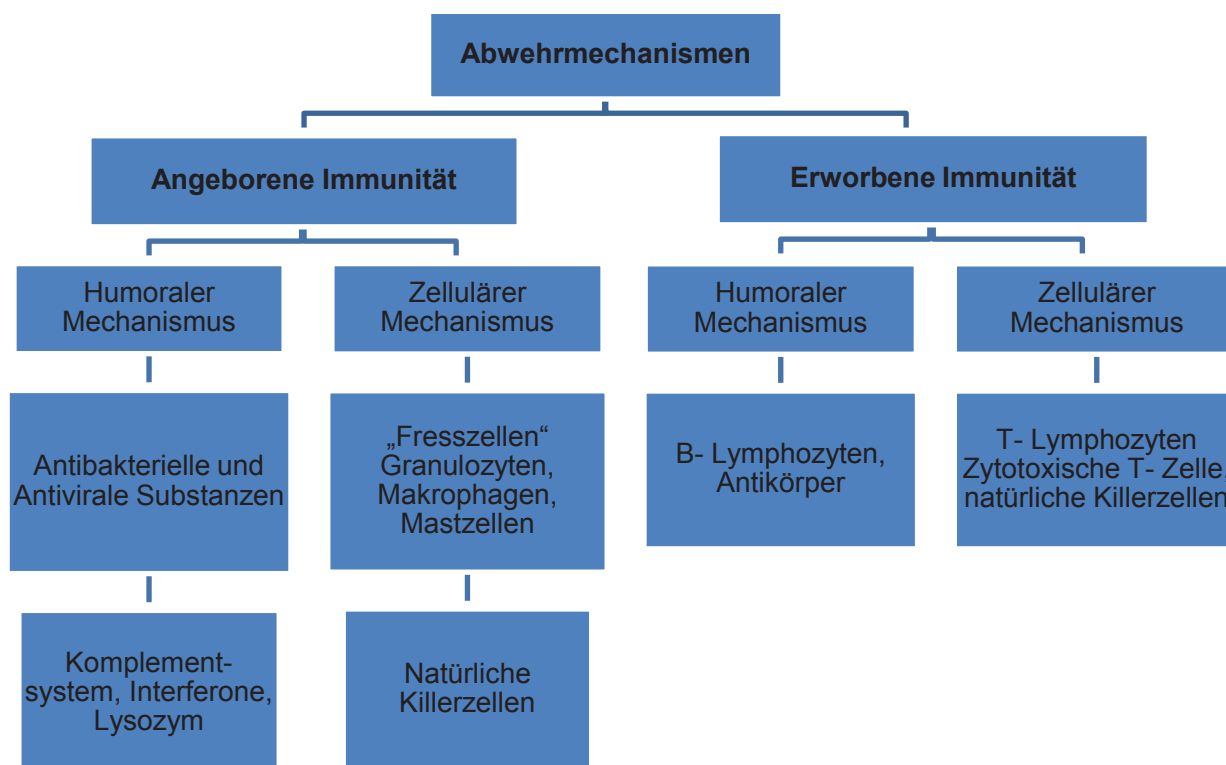


Abbildung 1: Abwehrmechanismen des Immunsystems

Nach einer allogenen Stammzelltransplantation ist das Immunsystem des Patienten durch Konditionierungstherapie, Immunsuppression und Mangel an immunkompetenten transplantierten T-Zellen anfällig für diverse opportunistische Infektionen. Eine eventuell auftretende akuten GvHD schwächt die Abwehr des

Patienten durch eine Begleitlymphopenie zusätzlich (Ottinger et al. 1996; Roberts et al. 1993).

Bei unkompliziertem Verlauf erfolgt die hämatopoetische Rekonstitution und die Wiederherstellung der unspezifischen zellulären Immunität, repräsentiert durch Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen, sehr schnell, meist innerhalb der ersten 30 Tage. Besonders bei Patienten nach allogener, aber auch autologer Stammzelltransplantation spielt diese angeborene Immunität gegen eindringende Bakterien und Pilze eine wichtige Rolle.

Van den Broek et al. beschreiben eine rasche Erholung der Phagozytosefähigkeit mit aber noch eingeschränkter Fähigkeit zur intrazellulären Keimabtötung mittels „oxidativem Burst“ in der Frühphase nach allogener KMT (Van den Broek et al. 1981; Miyagawa & Klingemann 1997). Diese Fähigkeit scheint stimulusabhängig entwickelt zu sein, wobei Volk et al. eine positive Korrelation zwischen einer Stimulationsfähigkeit mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) bei neutrophilen Granulozyten mit dem individuellen Risiko der Entstehung infektiöser Komplikationen in Verbindung bringen (Volk et al. 2000; Dayyani et al. 2003; Krause et al. 2003).

Dagegen benötigt die komplizierter strukturierte zelluläre Immunität (B- und T-Zellen) bedeutend länger bis zu ihrer Rekonstitution. Bei Erwachsenen kann dieser Prozess Monate bis Jahre dauern, im Kindesalter geht dies meist deutlich schneller.

2.3 Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation

2.3.1 Entstehung der Transplantat–gegen–Wirt–Reaktion (GvHD)

Die häufigste und langfristige Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation ist die GvHD. Darunter versteht man eine immunologische Unverträglichkeitsreaktion zwischen Transplantat und Empfängergewebe. Während der frühen Phase der Transplantation ist mit ihr eine erhöhte Komplikations- und Infektionsrate verbunden. Im weiteren Verlauf sind Auftreten und Schweregrad in hohem Maße entscheidend für die Lebensqualität und das Langzeitüberleben des Patienten.

Die Einteilung der GvHD erfolgt zum einen historisch nach ihrem Manifestationszeitpunkt, zum anderen nach Schweregraden. Als akute GvHD wird

eine immunologische Unverträglichkeitsreaktion, welche innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation auftritt, bezeichnet. Ausgelöst wird sie durch Spender-T-Zellen, die auf Unterschiede zwischen polymorphen Histokompatibilitäts-Antigenen reagieren. Als typische Manifestationsorgane sind hier die Haut, mit Auftreten eines makulopapulösen Exanthems, die Leber, durch Veränderung der Leberwerte (insbesondere eine Bilirubinerhöhung) und der Gastrointestinaltrakt mit Durchfällen zu nennen. Eine Einteilung nach Schweregraden der jeweiligen Manifestation oder deren kombiniertes Auftreten erfolgt von Grad I-IV (Lee et al. 2005).

Stärkster und bedeutendster Risikofaktor ist die genetische Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) zwischen Spender und Empfänger. HLA-Proteine sind sehr polymorph und werden auf den Major-Histokompatibilitäts-Komplexen (MHC) kodiert. Ihre Einteilung erfolgt je nach Expressionsort in zwei Klassen. Zur Klasse I gehören HLA-A, HLA-B und HLA-C. Sie sind auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen zu finden. Die HLA-Merkmale der Klasse II werden vorrangig auf hämatopoetischen Zellen exprimiert, können aber bei inflammatorischen Vorgängen auch auf vielen anderen Zellen in Erscheinung treten. Zu ihnen zählen die Antigene DR, DQ und DP. In diversen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in den HLA-Antigenen zwischen Spender und Empfänger die Hauptursache einer akuten GvHD darstellen und ein direkter Zusammenhang zwischen der HLA-Differenz und dem Auftreten einer akuten GvHD besteht (Lee 2005; Flomberg et al. 2004; Toubai et al. 2008).

Weniger gut ist der Zusammenhang zwischen einer HLA-Differenz und dem Auftreten einer chronischen GvHD untersucht. In einigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen differenten HLA-Antigenen der Klasse I und dem Auftreten einer chronischen GvHD gezeigt werden. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten GvHD in einer HLA-differenten Konstellation und der Entstehung reaktiver Spender-T-Zellen konnte nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass eine HLA-Inkompatibilität die Entstehung einer akuten und einer chronischen GvHD unterstützt. Offen ist noch, welche spezifischen Konstellationen zu welchem klinischen Bild, akuter oder chronischer GvHD führen. Obwohl man meist eine Stammzelltransplantation zwischen HLA-identischen Personen anstrebt, kommt es trotzdem regelmäßig zum Auftreten einer akuten bzw. einer chronischen GvHD (Mutrata et al. 2003; Bleakley & Riddel 2004).

Zusätzlich zu den HLA-Antigenen gibt es eine weitere Gruppe von Antigenen, die Minor-Histokompatibilitäts-Antigene (miHAs), die im Falle einer Stammzelltransplantation ebenfalls zum Auftreten einer GvHD führen können. Hierbei handelt es sich um Proteinprodukte von polymorphen Genen. Diese werden im Empfänger präsentiert, nicht aber in den Zellen des Spenders. (Mutrata M et al. 2003; Bleakley M & Riddel SR 2004; Toubai T et al. 2008).

Die pathophysiologischen Vorgänge bei der Entstehung der akuten GvHD sind mittlerweile relativ gut verstanden. Ausgelöst wird der Schaden am Zielorgan durch zytotoxische Spender-T-Zellen, die auf genetische Unterschiede polymorpher Antigene des Empfängers reagieren. Diese werden von APCs sowohl des Empfängers als auch des Spenders exprimiert. Unterstützt wird diese Reaktion durch nicht-spezifische inflammatorische Mediatoren. Beeinflusst durch die vorangegangene Konditionierungstherapie mit Chemo- und / oder Strahlentherapie und die damit verbundene Gewebsschädigung bietet der Organismus des Patienten mehrere Angriffspunkte für die Entstehung einer akuten GvHD. Zusammengefasst werden diese in Abbildung 2 (vgl. Travnik et al. 2011):

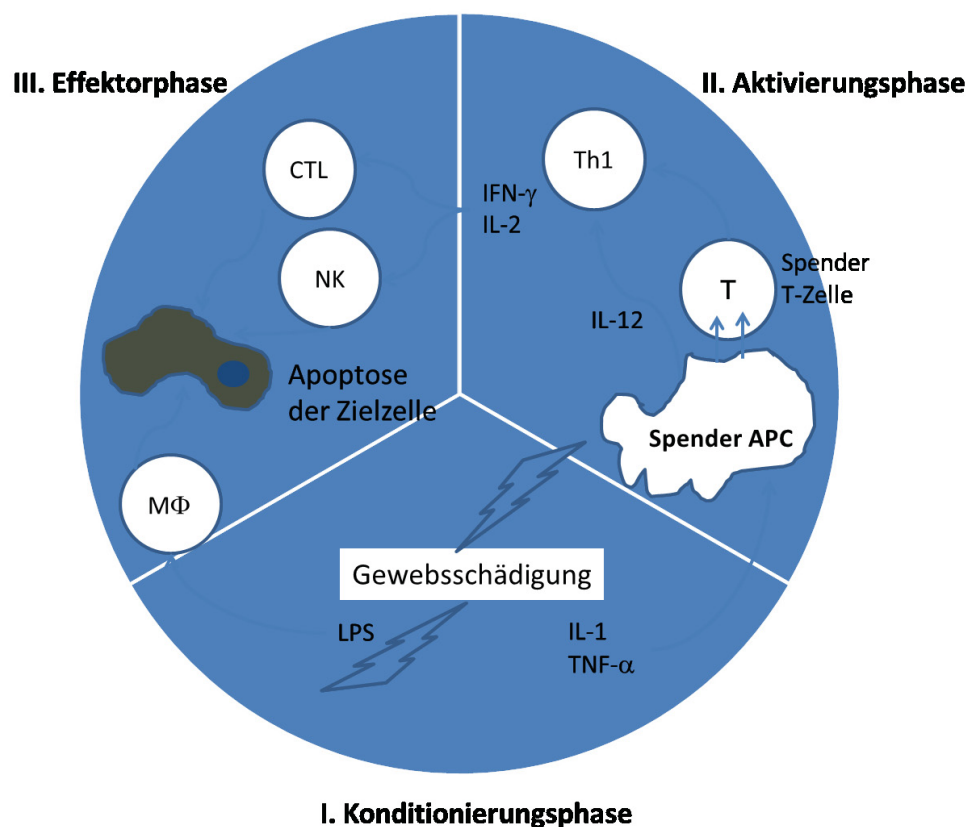


Abbildung 2: Angriffspunkte für die Entstehung einer akuten GvHD

Dieser Prozess kann in drei Phasen unterteilt werden. Die erste wird als Konditionierungsphase bezeichnet. Hierbei entsteht ein Gewebsschaden. Dieser führt zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α). Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung von APC's. Diese Aktivierung löst wiederum eine Zytokinausschüttung mit nachfolgender alloreaktiver T-Zelldifferenzierung in Th1-Zellen aus. Die Zytokinzusammensetzung entspricht derer der Th1-Antwort von Lymphozyten mit den Botenstoffen Interferon γ (IFN- γ) und Interleukin-2 (IL-2). Diese zweite Phase wird Aktivierungsphase genannt. In der dritten Phase, der Effektorphase, erfolgt eine Apoptose der Zielzellen und somit eine Zielgewebsschädigung durch die Mitwirkung aktivierter Makrophagen, natürlicher Killerzellen (NK) und zytotoxischer T-Lymphozyten (CTL) (Hill et al. 2000).

Nach allogener Stammzelltransplantation liegt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer akuten GvHD Grad II-IV bei 35-50%, abhängig von der Art des Transplantats, des Patientenalters, der Konditionierungstherapie und anderer Risikofaktoren (Lee et al. 2005).

Im Gegensatz zu der Entstehung einer akuten GvHD scheinen die Abläufe bei der Entstehung einer chronischen GvHD komplizierter und sind noch zu weiten Teilen unverstanden. Es fehlen geeignete Tiermodelle, die alle Eigenschaften einer chronischen GvHD des Menschen repräsentieren. Obwohl es Untersuchungen in diese Richtung gibt, ist eine Übertragung auf den Menschen schwierig (Lee 2005; Toubai et al. 2008).

Das Auftreten einer GvHD nach Tag 100 wird historisch als chronische GvHD bezeichnet. Sie kann sowohl als Folge einer akuten GvHD (progressive), als auch nach einem krankheitsfreien Intervall (quiescent) auftreten. Auch kann sie ohne eine vorangegangene akute GvHD (de novo) entstehen (Sullivan et al. 1991; Lee et al. 2005).

Von besonderer Bedeutung ist die Ähnlichkeit des klinischen Erscheinungsbildes mit dem verschiedener Autoimmunerkrankungen. Die chronische GvHD hat ganz unterschiedliche klinische Manifestationen und kann sich im Gegensatz zur akuten GvHD an vielen verschiedenen Organsystemen zeigen. Eine klinische Einteilung nach Schweregrad und Organmanifestation ist Tabelle 2 (Filipovich et al. 2005) zu entnehmen.

Schweregradeinteilung der chronischen Graft-versus-Host-Disease

Schweregrad der chronischen GvHD:	Mild	Moderat	Schwer
Zahl der betroffenen Organsysteme:	1–2	≥3	≥3
Schwere der Organmanifestationen:	Mild (außer Lunge)	Mild-moderat (Lunge nur mild)	Schwer (Lunge moderat oder schwer)

Tabelle 2: Schweregradeinteilung der chronischen GvHD

Im Allgemeinen zeigt sich ein der Sklerodermie ähnliches Krankheitsbild mit Trockenheit der Schleimhäute, Sklerose und Strikturen. Betroffene Organe können die Haut (Sklerose), Mund (Xerostomie), Augen (Xerophthalmie), Vagina, Ösophagus, Leber, Lunge (Bronchiolitis obliterans), Fasciitis, Serositis (perikardiale und pleurale Beteiligung eingeschlossen) und die Nieren mit einem nephrotischen Syndrom sein (Lee et al. 2006; Sullivan et al. 1991).

Die Arbeitsgruppe um Svegliati konnte 2007 erstmals eine neue Subgruppe von Autoantikörpern bei Patienten mit chronischer GvHD nachweisen. In Analogie zur systemischen Sklerose handelt es sich hierbei um gegen den PDGF (platelet-derived growth factor)-Rezeptor gerichtete Autoantikörper. Svegliati und Kollegen konnten zeigen, dass diesen eine funktionelle Bedeutung bei der Entstehung fibrotischer Veränderungen, typisch denen bei der chronischen GvHD zukommt. Mit aus dem Serum aufgereinigtem Immunglobulin G konnten eine Phosphorylierung der PDGF-Rezeptoren (alpha und beta) und die dadurch vermittelte ROS-(reactive oxygen species)-Produktion sowie eine gesteigerte Synthese von Kollagen Typ I gezeigt werden. Diese Veränderungen ließen sich nur im Serum von Patienten induzieren, welche an einer schweren chronischen GvHD litten. Bei gesunden Probanden und stammzelltransplantierten Patienten ohne das Auftreten einer chronischen GvHD waren keine Autoantikörper gegen die PDGF-Rezeptoren nachweisbar (Svegliati et al. 2007).

Einige experimentelle Daten zeigen im Tierversuch einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten spezifischer T-Zellen bei Tieren mit chronischer GvHD und einer bestimmten Konstellation von MHC-Molekülen der Klasse II. Diesen T-Zellen wird unterstellt, autoreaktiv zu sein und mit einem thymalen Schaden und dadurch fehlender thymaler negativer Selektion verbunden zu sein. Dies würde bedeuten, dass die Hauptursache einer chronischen GvHD in nicht-polymorphen Antigenen zu suchen ist (Teshima et al. 2003; Sakoda et al. 2007). Verschiedene klinische Daten

zeigen jedoch eine strenge Korrelation zwischen einer ubiquitären Expression von miHAs und dem Auftreten einer chronischen GvHD. Dieses Auftreten führt zu einer ständigen T-Zell-Stimulation, welche dann den Endorganschaden bewirkt (Miklos et al. 2005).

Noch offen ist die Bedeutung einer B-Zell-Beteiligung bei der Entstehung einer chronischen GvHD.

Eine gesicherte pathophysiologische Theorie zur Entstehung der chronischen GvHD gibt es aktuell noch nicht. Dies wäre aber für Prophylaxe und Therapie von großer Bedeutung (Lee et al. 2008; Miklos et al. 2005; Shlomchik 2007).

2.3.2 Infektiöse Komplikationen

Das neu entstehende Immunsystem ist durch die notwendige Immunsuppression und einem eventuellem Auftreten einer akuten GvHD geschwächt. Dadurch ist der Patient anfällig für die Entwicklung unterschiedlicher infektiöser Komplikationen. Dies zeigt sich durch eine verminderte zelluläre Immunität und eine Hypogammaglobulinämie. Trotzdem ist die Immunsuppression im Hinblick auf die Vermeidung einer GvHD und somit für den langfristigen Erfolg einer Transplantation von grundlegender Bedeutung. Infektionen in dieser Phase können sowohl als Neuinfektion als auch als Reaktivierung auftreten. Zu den endogenen Infektionen gehören insbesondere solche mit Viren der Herpes-Gruppe, das Hepatitis-B-Virus und Candida-Infektionen. Besonders gefürchtet ist die Reaktivierung des Cytomegalievirus (CMV). Zu einer CMV-Reaktivierung kommt es bei 60-70% der serologisch CMV-positiven, stammzelltransplantierten Patienten. Vor Transplantation wird der Serostatus des Empfängers bei der Auswahl des Transplantates beachtet. Bei Seronegativität versucht man einen seronegativen Spender zu finden. Ebenfalls sollten Blutprodukte seronegativ und Leukozyten-depletiert sein. Bei Seropositivität ist eine kontinuierliche Überwachung nach vorgegebenen Schemen bis Tag +180 von besonderer Bedeutung. Gefährdet sind Patienten mit einer Reaktivierung vor Tag +100 und daraus folgender mehrwöchiger antiviraler Therapie, chronischer GvHD, lang anhaltender Immunsuppression, T-Zell-Depletion und dosisreduzierter Konditionierungstherapie. Hier sollte die Überwachung länger, mitunter bis zu einem Jahr andauern (Boeckh et al.1996; Einsele et al. 2001). In den vergangenen Jahren wurde eine Virämie entweder über das Antigen pp65 oder durch quantitative PCR nachgewiesen. In den meisten Zentren erfolgt ein Monitoring wöchentlich, bei einer

Gesamtleukozytenzahl $>1000 / \mu\text{l}$ mittels der Bestimmung des CMV-pp65 Antigen, bei Neutropenie über eine CMV-PCR. Ist eine CMV-Reaktivierung nachgewiesen (als beweisend gilt entweder der einmalige Nachweis des CMV-pp65 Antigens oder die zweimalig positive PCR) werden die Patienten ein bis zwei Wochen mit einem Ganciclovirprodukt als Induktionstherapie behandelt. Anschließend wird für weitere sechs Wochen die Dosis auf die Hälfte reduziert. Bei Organbefall mit CMV wird die Induktionstherapie auf drei bis vier Wochen verlängert (Young 2008).

Leichter zu erkennen als eine CMV-Reaktivierung ist eine Reaktivierung des Varizella-Zoster-Virus (VZV). Charakteristisch sind die schmerzhaften Bläschen in einem begrenzten Dermatom. Diese treten im Mittel fünf Monate nach allogener Stammzelltransplantation auf (Steer et al. 2000). Einige Zentren bevorzugen im ersten Jahr eine kontinuierliche Prophylaxe mit Aciclovir oder Valciclovir, wohingegen andere die Therapie von der klinischen Notwendigkeit abhängig beginnen. Im Falle einer Exposition mit einer an Windpocken erkrankten Person ist der Serostatus für VZV vor der Transplantation von Bedeutung. Bei geringer Ansteckungsgefahr und Seropositivität ist keine spezifische Therapie nötig. Bei hoher Ansteckungsgefahr, wie das Zusammenleben der erkrankten Person im gleichen Haushalt und Seropositivität, wird eine Aciclovirprophylaxe begonnen, um einer möglichen Reaktivierung vorzubeugen. Bei Seronegativität und Exposition wird eine Therapie mit Hyperimmunglobulin eingeleitet (Weinstock et al. 2006). Gleichzeitig wird Aciclovir in therapeutischer Dosis gegeben (Young 2008).

Zu einer Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus (EBV) kommt es vermehrt nach einer *ex vivo* CD7-Depletion, nach haploidenter Transplantation oder Konditionierung mit Alemtuzumab. Dies ist insbesondere auch beschrieben bei Verwendung von Nabelschnurblut als Stammzellquelle (Burnstein et al. 2006). Aktuell gibt es keine einheitlichen Diagnoseschemen, so dass Diagnosezeitpunkt und Behandlungsabläufe variieren. Oft kommt es zu einer Reaktivierung des Virus ohne behandlungsbedürftige Klinik. Aktuell gibt es noch keine spezifische antivirale Therapie gegen EBV. Es besteht die Möglichkeit, die Ziellymphozyten mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab (anti-CD 20) zu behandeln oder eine Infusion von Spenderlymphozyten zur besseren Kontrolle einer akuten Reaktivierung (Young 2008).

Eine weitere endogene Infektion von klinischer Bedeutung sind die Candida-Infektionen. Das Hauptrisiko besteht innerhalb der ersten 30 Tage aufgrund der

Neutro- und Lymphopenie und der durch Chemo- oder Strahlentherapie entstandenen Schleimhautschäden. Diese Schleimhautschäden können als Eintrittspforte für systemische Infektionen wirken. Ein guter diagnostischer Marker ist nicht vorhanden. Meist handelt es sich dabei um *Candida albicans*. Durch seinen besonderen Mechanismus zur Anheftung an der Darmwand ist dieser die vorherrschende Spezies im menschlichen Darm. Des Weiteren sind *Candida glabrata* und *Candida krusei* anzutreffen (Young 2008).

Zu den häufigsten exogen erworbenen Infektionen gehören die *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie und die Aspergillose.

Eine *Pneumocystis*-Infektion kann insbesondere zwischen Tag +40 und +80 auftreten. Routinemäßig wird eine Prophylaxe mit Trimetoprim und Sulfamethoxazol gegeben. Eine CD4-Zell-Bestimmung ist hier aufgrund der ohnehin bestehenden Immunsuppression nicht üblich. Ebenfalls wirksam ist diese Prophylaxe gegen Infektionen mit *Nocardiose*, *Toxoplasmose*, *Haemophilus*-Spezies und verschiedene *Staphylokokken*.

Die Aspergillose ist eine durch Sporen von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavus* verursachte Erkrankung. Klinisch schmerzlos erfolgt eine Besiedelung der Nebenhöhlen und der Lunge meist im Median um Tag 96 nach Ende der absoluten Neutropenie bei aber noch bestehender Immunsuppression. Der Nachweis erfolgt nach Möglichkeit aus der bronchoalveolären Lavage, da der Antigennachweis aus dem Blut nur eine geringe Sensitivität besitzt (Wingard et al. 2010).

Eine weitere Gruppe für Infektionen stellen Viren des respiratorischen Systems dar. An erster Stelle sind RSV-Infektionen (respiratory syncytial virus) zu nennen. Weitere Viren des respiratorischen Systems sind Influenza, Parainfluenza, das humane Metapneumovirus, Adenoviren, Enteroviren und Rhinoviren. Mit Ausnahme der Parainfluenzaviren handelt es sich um saisonale Infektionen. Diagnostisch am bedeutendsten sind die klinischen Symptome. Die antivirale Therapie ist sehr davon abhängig um welches Virus es sich bei der jeweiligen Infektion handelt (Young 2008).

Zusammenfassend ist ein Patient während der Phase der Stammzelltransplantation und der nachfolgenden immunsuppressiven Therapie sowohl für endogene als auch exogene Infektionen gefährdet. Bedeutendste Prophylaxe ist die Vermeidung möglicher Risikoquellen und das rasche gezielte Eingreifen bei Auftreten von Infektionen.

2.4 Funktionelle Aspekte von Granulozyten und Monozyten

2.4.1 Chemotaxis und Migration

Unter Chemotaxis versteht man eine gerichtete Bewegung von Organismen, ausgelöst durch chemische Reize entlang eines Konzentrationsgradienten. Monozyten und Makrophagen sind wichtige Zellen für die schnelle angeborene spezifische Immunabwehr. Die im Blut zirkulierenden Monozyten werden mittels chemotaktischer Lockstoffe, so genannte Zytotaxine und Chemotaxine angelockt und wandern mittels amöboiden Bewegungen in das entzündete Gewebe ein (Müller & Müller-Hermelink 2004; Schubert et al. 1981). Sie können als Antwort auf die Zytokinfreisetzung (u.a. IFN γ) durch T-Zellen aktiviert werden. Ihre Aktivierung führt zur Sekretion verschiedener Zytokine (IL-1, TNF- α , IL-6). Sowohl die Bakterienabtötung als auch die Zytokinfreisetzung wird durch Stickoxide (NO), einem zellulären Abbauprodukt vermittelt. Die Zytokinfreisetzung bewirkt die Aktivierung der Akute-Phase-Proteine, welche die Elimination opsonierter Pathogene erleichtern (Burmester 2003; Müller & Müller-Hermelink 2004). Des Weiteren haben diese Zytokine Einfluss auf eine Region des Hypothalamus, welche für die Entstehung von Fieber und die Granulozytenmobilisation aus dem Knochenmark verantwortlich ist. IL-1 und TNF- α sorgen für einen Anstieg der Kapillarpermeabilität und erleichtern so die Einwanderung von Zellen ins Gewebe. IL-8 ist das für die Chemotaxis verantwortliche Zytokin. Dieses unterstützt die Entzündungsreaktion durch die Bereitstellung von Granulozyten und Einleitung einer inflammatorischen Reaktion im Zielgewebe. Granulozyten und Makrophagen arbeiten eng bei der Phagozytose eindringender Pathogene zusammen um einen Gewebsschaden, entstanden durch proteolytische Zerlegung, möglichst gering zu halten (Burmester 2003). Sowohl endogene als auch exogene Stoffe können eine chemotaktische Wirkung haben. Dazu gehören unter anderem Sekretionsprodukte von Lymphozyten und Mastzellen, Lymphokine, verschiedene Komponenten des Komplementsystems wie C3a und C5a, IL-8 (Interleukin 8), LTB-4 (Leukotrien B-4), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), TGF- β (transforming growth factor β), 12-HETE (12-hydroxyeicosatetranoic acid) und β -HCG (human chorionic gonadotropin). Ebenfalls kann diese Funktion von Produkten geschädigter Zellen, Formylpeptide von Bakterien wie zum Beispiel fMP (Formyl-Methionyl-Phenylalanin) oder fMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), durch Bakterientoxine oder Tuberkelproteine

übernommen werden (Müller & Müller-Hermelink 2004; Roitt 2004; Schubert & Bethke 1981; Sperber 1994).

2.4.2 Phagozytose und „oxidativer Burst“

Entdeckt wurde der Prozess der Phagozytose durch Ilja Iljitsch Metschnikow. Er bekam dafür zusammen mit Paul Ehrlich 1908 den Nobelpreis.

Unter Phagozytose (griechisch φαγεῖν: Fressen) versteht man einen dynamischen, energieabhängigen, ATP-verbrauchenden Prozess der Aufnahme und Ingestion von korpuskulären Partikeln (>250 nm) in eine eukaryontische Zelle. Die aufgenommenen Partikel gelangen in Phagosomen, in denen sie im weiteren Verlauf durch Hydrolasen abgebaut werden. Phagozytose ist eine der wichtigsten Aufgaben von Monozyten und Makrophagen.

Zu Phagozytose befähigte Zellen sind neben Monozyten und Makrophagen auch polymorphkernige Leukozyten. Sie sind in der Lage, Antigene zu phagozytieren und dadurch zu eliminieren. Zusätzlich verbessert wird dieser Prozess durch Anlagerung von Komplementfaktoren an die Bakterien. Gleichzeitig können diese Makrophagen die Aktivierung der Effektorzellen der erworbenen Immunität auslösen. Diese können dann wiederum ihrerseits definierte Antikörper produzieren. Antigene, die bereits von Antikörpern umgeben sind, werden leichter phagozytiert, sodass sich ein Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des Immunsystems ergibt, um einen eingedrungenen Erreger möglichst schnell und effektiv zu eliminieren (Neumann 2008).

Der Vorgang der Aktivierung von Monozyten kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden - beginnend mit der Chemotaxis. Hierunter versteht man, wie im vorangegangenen Abschnitt ausführlich beschrieben, die gerichtete Bewegung der Phagozyten entlang eines Konzentrationsgradienten von Mediatoren. Darauf folgt die Adhärenz, das heißt ein Anhaften des Mikroorganismus an die Oberfläche des Phagozyten. Der nächste Schritt ist eine Membranaktivierung, hier beginnt die Aufnahmephase. Unter der eigentlichen Phagozytose versteht man das Einschließen und Umschließen des Mikroorganismus durch Zytoplasmaausläufer, so genannte Pseudopodien, des Phagozyten. Darauf folgt die Phagosomenbildung, eine Vereinnahmung des Mikroorganismus in einer Vakuole. Diese Vakuole wird in der Phase der Fusion mit dem Lysosom im Zytoplasma des Phagozyten verschmolzen. Hier erfolgt die Abtötung und Verdauung. Die phagozytierten Partikel werden durch

nicht-oxidative Mechanismen (Enzyme wie z.B. Elastase, Proteinase 3, Cathepsine, saure Phosphatase u.a.) oder durch oxidative Prozesse wie die Bildung freier Sauerstoffradikale („oxidativer Burst“) abgetötet. Zum Schluss werden die Abbauprodukte freigesetzt.

Durch humorale Faktoren kommt es zu einem Anstieg der Monozyten und einer Migration der Monozyten aus der Blutbahn an den Ort der Entzündung. Hier erfolgt die Umwandlung von Monozyten in Makrophagen. Der Prozess der Phagozytose wird an dieser Stelle begonnen. Die Abwehrreaktion beginnt mit der Adhäsion der Monozyten an die Gefäßwand (Sperber 1994; Roith 2001; Burmester et al. 2003). Von dort gelangen sie via Diapedese durch komplementvermittelte Gefäßpermeabilitätssteigerung ins Gewebe.

Das Komplementsystem besteht aus einer Reihe von Proteinen, die bei einer Infektion eine Kaskade von Entzündungsmediatoren im Blutplasma bilden und zum Beispiel durch das Eindringen von Bakterien aktiviert werden. Durch seine Aktivierung kommt es zu genannter Gefäßpermeabilitätssteigerung, zur Exsudation von Komplementfaktoren, zur Bindung von C3b an das Bakterium und zur Freisetzung von Mediatoren aus Makrophagen und Mastzellen durch Bindung von C3a und C5a. Diese führen dann zu Kapillardilatation und Exsudation von Plasmaproteinen, welche eine chemotaktische Anziehungskraft auf polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen ausüben (Langermans et al. 1994; Roitt 2001).

Durch die Opsonierung der eingedrungenen Partikel mit Beteiligung der Immunglobuline IgG und IgM kann der Prozess der Phagozytose noch beschleunigt werden (Langermans et al. 1994; Roitt 2001).

Monozyten und Makrophagen verfügen über eine Reihe von Rezeptoren, sogenannte PPR (pathogen pattern receptors), und sind zur Antigenpräsentation befähigt. Dadurch sind sie zusätzlich in der Lage immunologische Prozesse zu aktivieren, die eine wichtige Rolle bei der Antikörperproduktion spielen (Krumholz et al. 2002; Burmester 2003). Sie stellen somit eine wichtige funktionelle Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem spezifischen Immunsystem dar.

2.4.3 Monozytensubpopulationen

Monozyten sind die Vorläufer von Makrophagen. Aus myeloiden Stammzellen im Knochenmark entstehen Monoblasten, Zellen mit ausgeprägter Fähigkeit zur Zellerneuerung. Diese werden nach weiterer Ausreifung in das periphere Blut ausgeschwemmt. Dort zirkulieren sie mit einer Halbwertszeit von circa drei Tagen. Sie sind in großer Zahl an den Endothelien der Gefäßwände anzutreffen und wandern im Verlauf in das Gewebe ein, wo dann je nach Gewebe die Umwandlung in spezifische Makrophagen, zum Beispiel Alveolarmakrophagen, erfolgt (Burmester et al. 2003).

Ihre Funktion besteht in der Bekämpfung mikrobieller Infektionen und anderer Entzündungen. Sie sind zudem an der Regulation der Immunantwort beteiligt. Eine weitere Aufgabe ist die Elimination überalterter und alterierter Zellen. Durch Produktion unterschiedlicher Zytokine beeinflussen sie die Hämatopoese. Im Vollblut stellen die Monozyten 4-10% aller kernhaltigen Zellen dar, was circa 250-850 Zellen / μl entspricht (Hübl et al. 1997).

Die Mannigfaltigkeit der Gewebsmakrophagen in Bezug auf ihre Größe, ihre Morphologie und auch ihre Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene ist schon in der Monozytenpopulation zu beobachten (Passlick 1989; Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996).

Durch die Anfärbung der Leukozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen CD14 und CD16 gelingt die Differenzierung in zwei unterschiedliche Monozytensubpopulationen: klassische Monozyten die eine starke CD14-Positivität ohne CD16-Nachweis zeigen (CD14++CD16- Monozyten) und Monozyten mit nur schwacher CD14-Positivität aber gleichzeitiger CD16-Expression (CD14+CD16+ Monozyten). Der CD16-Rezeptor ist ein niedrigaffiner, transmembranöse Rezeptor für den konstanten Teil eines Antikörpers der IgG-Klasse (Fc-Rezeptor der Klasse III) und vermittelt sowohl die Phagozytose als auch die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (Ziegler-Heitbrock 1996; Delves 2000).

In der Zweifarbenfluoreszenz gelingt gewöhnlich die Unterscheidung zwischen den beiden Monozytensubpopulationen ohne größere Schwierigkeiten. Allerdings ist bei einigen Proben ein kontinuierlicher Übergang der beiden Zellwolken zu beobachten, was die genaue Abgrenzung erschwert. Es gibt aktuell noch keine Untersuchungen an einer größeren Anzahl gesunder Kontrollspender. Trotzdem ist davon

auszugehen, dass die CD14⁺CD16⁺ Monozyten in der Regel 10% aller Monozyten, was einer absoluten Zellzahl von ca. 50 Zellen / μ l entspricht, ausmachen (Ancuta et al. 2000; Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996). Phänotypisch zeigen diese Zellen eine typische monozytäre Morphologie. Sie scheinen aber im Vergleich zu CD14⁺⁺ Zellen etwas kleiner zu sein, sodass sie im Punktdiagramm („Dotplot“-Analyse) mit Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung in einem Bereich zwischen Lymphozyten- und Monozytenwolke zu liegen kommen. In einigen Studien konnte eine niedrige Expression des CD33-Oberflächenmoleküls, ein promyelozytisches Stammzellantigen, auf Monozyten nachgewiesen werden (Calzada-Wack et al. 1996). Dieses Oberflächenmolekül nimmt in seiner Expressionsdichte mit zunehmendem Reifegrad der Monozyten ab (Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996; Calzada-Wack et al. 1996). Besonders Alveolarmakrophagen, aber auch andere Gewebsmakrophagen, exprimieren CD16 auf ihrer Zelloberfläche. Eine Zunahme dieses Rezeptors konnte von Ziegler-Heitbrock et al. bei *in vitro* Kultivierung dieser Zellen nachgewiesen werden. Daraus folgt die Annahme, dass CD14⁺CD16⁺ Monozyten als eine reifere Subpopulation der Monozyten angesehen werden können, welche noch nicht die Endothelschranke passiert haben aber dennoch schon im Blut Merkmale von Gewebsmakrophagen aufweisen (Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996).

Zusätzlich besitzen Monozyten der CD14⁺CD16⁺ Subpopulation im Vergleich zu den klassischen CD14⁺⁺ Monozyten eine höhere Expression der Antigene CD11a und c, welche an ICAM-1 (intracellular adhesion molecule) binden, und von VLA-4 (very late antigen), welches an VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule) bindet (Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996).

Zur Erleichterung der Migration der Leukozyten an Entzündungsherden ins Gewebe werden diese beiden Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und VCAM-1) hochreguliert. Durch die erhöhte Antigendichte von CD11a, CD11c und VLA-4 können die CD14⁺CD16⁺ Monozyten vermutlich schneller als die CD14⁺⁺ Monozyten ins Gewebe einwandern (Ziegler-Heitbrock 1996).

3 Ziele der Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand in der funktionellen Untersuchung der zeitlichen Rekonstitution neutrophiler Granulozyten und Monozyten nach allogener peripherer Stammzelltransplantation.

Die Arbeit gliederte sich hierzu in zwei Teile, Vorarbeiten mit 14 eingeschlossenen Patienten und einen Hauptteil mit 30 untersuchten Patienten.

Das Ziel der Vorarbeiten bestand in einer Untersuchung der neutrophilen Granulozyten nach allogener PBSCT. Es sollte die Funktionalität dieser Zellen im Hinblick auf ihre Migrationsfähigkeit und die Durchführung des „oxidativen Burst“ zwischen den Tagen +30 und +40 nach allogener PBSCT getestet werden. Hierfür wurden Vollblutproben an einem Tag des definierten Zeitraums nach Transplantation entnommen.

Alle Untersuchungen wurden mittels Durchflusszytometrie angefertigt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem „Statistical Program for Social Science“ (SPSS, Chicago, IL). Die Signifikanzberechnungen wurden mit dem Student's *t*-test durchgeführt. Als signifikant wurde $p \leq 0,05$ angesehen.

Die Migrationsfähigkeit sollte nach vorheriger Inkubation der neutrophilen Granulozyten mit dem chemotaktischen Peptid fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) gemessen werden. Als Marker für die erfolgte Migration sollte die Herunterregulierung des Adhäsionsmoleküls LECAM-1 dienen. Die Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ sollte nach Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe), dem Proteinkinase C-Liganden PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) oder opsonierten Bakterien (*E. coli*) und nachfolgender Inkubation mit dem Substrat DHR (Dihydrorhodamin-123) bestimmt werden. Die intrazelluläre Umwandlung von DHR in das grüne Fluoreszenzprodukt Rhodamin zeigte den erfolgten „oxidativen Burst“ an und sollte durchflußzytometrisch detektiert werden. Für beide Versuchsschritte sollten die kommerziell erhältlichen Testkits Migratest® und Phagoburst® der Firma ORPEGEN verwendet werden.

Der Hauptteil dieser Arbeit sollte die zeitabhängige Rekonstitution der Funktionalität neutrophiler Granulozyten und Monozyten nach allogener PBSCT untersuchen.

Dazu sollten an drei festgesetzten Zeitpunkten nach allogener PBSCT sowohl die Fähigkeit dieser Zellen zur Phagozytose nach Stimulation mit FITC-markierten *E. coli*

als auch die Ausübung des „oxidativen Burst“ nach Inkubation mit dem fMLP, PMA oder opsonierten *E. coli* mit schon beschriebener Umwandlung von DHR- 123 in Rhodamin bestimmt werden.

Hier sollte zusätzlich der Testkit Phagotest® der Firma ORPEGEN Anwendung finden. Zur durchflusszytometrischen Differenzierung der Monozytenpopulation sollte zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen CD14 erfolgen.

Zusätzlich sollten die „Ratio“ und die Absolutzellzahlen der CD14++CD16- versus der CD14+CD16+ Monozytensubpopulation ermittelt und mit dem klinischen Auftreten transplantations-assoziierten Komplikationen - insbesondere dem klinischen Erscheinungsbild einer akuten oder chronischen GvHD - korreliert werden. Dazu sollte nach Erythrozytenlyse eine Antikörperfärbung gegen CD14 und CD16 erfolgen. Absolute Zellzahlen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sollten dem Blut- und Differenzialblutbild (angefertigt im hämatologischen Labor der Universitätsklinik Jena) entnommen werden. Es sollten die absoluten Zellzahlen aus dem Verhältnis des weißen Blutbildes und der durchflusszytometrisch gewonnenen Daten rechnerisch ermittelt und mit den klinischen Daten aus der Patientendokumentation korreliert werden.

4 Publierte Originalarbeiten

4.1 Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation.

Rommeley Maraike, Spies-Weisshart Baerbel, Schilling Kristina, Hochhaus Andreas, Sayer Herbert G., Scholl Sebastian; Journal of Cancer Research Clinical Oncology 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-011-0989-X

Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation

Maraïke Rommeley · Baerbel Spies-Weisschart ·
Kristina Schilling · Andreas Hochhaus ·
Herbert G. Sayer · Sebastian Scholl

Received: 11 March 2011 / Accepted: 26 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose The aim of the study was to investigate the recovery of the innate immune system within the first 100 days after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) and to elucidate a potential correlation with such important events as severe infectious complications or graft-versus-host disease (GvHD).

Methods In 30 consecutive patients who underwent allogeneic PBSCT, absolute numbers of neutrophils and monocytes were determined and different functional analyses performed at different time points (day +30, +60 and +90, respectively). The capacity to phagocyte *Escherichia coli* (*E. coli*) as well as the induction of oxidative burst after incubation with different stimuli (Phorbol-12-myristate-13-acetate; PMA, the chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe; f-MLP or opsonized *E. coli*) were analysed after engraftment.

Results There was a rapid reconstitution concerning the capability of both neutrophils and monocytes to phagocyte *E. coli* without a significant increase between day +30 and +90. In contrast, a twofold increase of monocyte oxidative burst after incubation with PMA at day +90 was observed ($P = 0.017$). Furthermore, the ability of neutrophils to induce oxidative burst after ingestion with *E. coli* was impaired on day +30 with a significant functional reconstitution on day +60 ($P = 0.01$). The oxidative burst activity following incubation with f-MLP did not show significant changes after stem cell engraftment. Analysis of

numeric reconstitution of CD14+CD16+ monocytes demonstrated a potential correlation with a decreased incidence of chronic GvHD.

Conclusion The functional recovery of neutrophils and monocytes in the early period after allogeneic PBSCT differs not only concerning phagocytosis and oxidative burst but also with respect to the stimulus and the cell population that was analysed for oxidative burst activity. The subset of CD16+CD14+ monocytes might be a predictor for a reduced risk of chronic GvHD.

Keywords Neutrophils · Monocytes · Innate immune system · CD14+CD16+ · Allogeneic PBSCT

Introduction

The innate immune system is of fundamental importance for the defence against bacterial or fungal infections. Among the cellular components of the innate immunity, neutrophils and monocytes play a pivotal role not only because it represents the majority of cells as compared with natural killer (NK) cells. The defence mechanisms of the innate immune system can be observed immediately (0–4 h) while a response of adaptive immunity is much slower even in case of existing memory cells (4–96 h) (Kobayashi and DeLeo 2009; Yona and Jung 2010; Vivier et al. 2011). Nevertheless, there is a tight and complex interaction between the innate and the adaptive immune system. In detail, antigen-specific responses of adaptive immunity can be activated by distinct mechanisms of pathogen-specific innate immune recognition (Iwasaki and Medzhitov 2010; Diacovich and Gorvel 2010).

Several studies investigated the recovery of adaptive immunity after allogeneic stem cell transplantation

M. Rommeley · B. Spies-Weisschart · K. Schilling ·
A. Hochhaus · H. G. Sayer · S. Scholl (✉)
Abteilung Hämatologie/Onkologie, Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum Jena, Erlanger Allee 101,
07740 Jena, Germany
e-mail: sebastian.scholl@med.uni-jena.de

focussing on the reconstitution of different lymphocyte subsets. Such data are available for patients who underwent either allogeneic bone marrow transplantation (BMT) or allogeneic PBSCT resulting in a detailed knowledge of several factors that have an impact on lymphocyte repopulation following transplantation. Some of the most important factors beside the stem cell source are the conditioning regimen, the immunosuppression after transplantation, the reactivation of cytomegalovirus (CMV) and the occurrence of graft-versus-host disease (GvHD) (Ottinger et al. 1996; Roberts et al. 1993).

In contrast to allogeneic PBSCT, there are some reports of functional recovery on the innate immune system especially in patients who received allogeneic BMT or autologous PBSCT (Volk et al. 2000; Dayyani et al. 2004). In detail, Krause and colleagues reported on a rapid numeral engraftment of neutrophils and monocytes after autologous PBSCT that were associated with an impaired ability to secrete proinflammatory cytokines (Krause et al. 2003).

Furthermore, van den Broek could demonstrate a reduced intracellular killing of bacteria while phagocytosis itself was not impaired shortly after allogeneic BMT (Van den Broek et al. 1981). In accordance with this observation, Miyagawa reported on an unaffected phagocytosis while they found a diminished oxidative burst in patients who underwent allogeneic BMT (Miyagawa and Klingemann 1997).

Peripheral blood monocytes represent a highly variable cell population regarding size, morphology and expression of surface antigens (Passlick et al. 1989; Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996). By means of two-colour flow cytometry staining, the CD14 and CD16 antigens, two major populations of monocytes can be distinguished. The surface antigen CD16 represents a low-affinity Fc receptor that mediates not only phagocytosis but also antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) of monocytes, neutrophils and NK cells (Delves and Roitt 2000; Ziegler-Heitbrock 1996). Flow cytometry analysis of monocytes in healthy volunteers can demonstrate a majority of CD14⁺⁺CD16[−] cells in contrast to about ten per cent of CD14⁺⁺CD16⁺ cells (Ancuta et al. 2000; Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996).

The subpopulation of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes are assumed to differentiate from CD14⁺⁺CD16[−] cells representing circulating precursors of macrophages. In detail, CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes demonstrate a higher expression of such antigens as CD11a, CD11c and VLA (very late antigen)-4 that are important for monocyte migration in case of inflammation (Ziegler-Heitbrock et al. 1993; Ziegler-Heitbrock 1996).

Previously, we could show that the ability of neutrophils to induce oxidative burst after ex vivo stimulation with

E. coli is highly impaired at day +30 after allogeneic PBSCT. Unexpectedly, there was no impairment regarding the migratory capacity of neutrophils shortly after transplantation (Scholl et al. 2007).

Therefore, the aim of our study presented as to investigate the capacity of oxidative burst as well as the ability of neutrophils and monocytes to phagocyte *E. coli* at three consecutive time points before day +100 after allogeneic PBSCT. Furthermore, we sought to determine the reconstitution of CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes in peripheral blood after allogeneic transplantation.

Patients and methods

Patient characteristics

This monocentric analysis was approved by the institutional review board of the Universitätsklinikum Jena, Germany. Thirty consecutive patients suffering from various hematologic malignancies were investigated after informed consent. Detailed patients' characteristics are summarised in Table 1. Most patients who were treated with a myeloablative regimen received hyperfractionated total body irradiation (TBI, 12 Gy) and cyclophosphamide (60 mg/kg at day −3 and −2). In addition, the protocols for patients treated with a reduced TBI (8 Gy) regimen contained either cyclophosphamide or fludarabine and were supplemented with antithymocyte globulin (ATG) in case of an unrelated donor. In contrast, most patients who received a dose-reduced conditioning therapy were treated according to the protocol published by Slavin (Slavin et al. 1998). In detail, patients received a conditioning regimen consisting of fludarabine (30 mg/m², day −10 to −5), busulfan (4 mg/kg at day −6 and −5) and ATG (10 mg/kg, day −4 to −1). All patients received a GvHD prophylaxis containing cyclosporine A (CSA), starting with 3 mg/kg at day −1 and consecutive adaptation according to serum level. Additional GvHD prophylaxis were given dependent on the applied conditioning protocol and additional risk factors for GvHD, e.g. patients receiving 12 Gy TBI were treated with methotrexate (MTX) on day 1 (15 mg/m²), followed by 10 mg/m² on days 3, 6 and 11 while patients with a HLA mismatch or an unrelated donor were additionally given mycophenolate mofetil (MMF), beginning on day +10. All patients were treated with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) subcutaneously starting from day +1 with 5 µg/kg body weight until stable neutrophil engraftment. CMV risk groups as indicated in Table 1 were defined according to recently published recommendations (George et al. 2010). In detail, in case of seronegativity of both donor and recipient, a patient was classified as 'low risk' while any constellation including

Table 1 Patients' characteristics ($n = 30$)

Patients' characteristics	$N = 30$
Sex (female/male)	15/15
Disease, cases	
AML/MDS/CML	18
ALL/NHL/CLL	11
AA	1
Median age at transplantation (range, years)	45 (20–63)
Donor, cases	
MRD	6
MUD	12
mMUD	12
Median CD34 content ($\times 10^6$ per kg, range)	6.0 (3.1–9.9)
Engraftment (WBC $> 1 \times 10^9/l$, range, days)	13 (9–25)
Conditioning, cases	
Myeloablative regimen	19
Dose-reduced regimen	11
ABO compatibility, cases	
ABO ident	10
Minor incompatibility	8
Major incompatibility	12
CMV risk group, cases	
Low risk	11
Intermediate risk	4
High risk	15
Acute GvHD	
None and grade I GvHD	17
GvHD grade II–IV	13

AML indicates acute myeloid leukaemia, AA aplastic anaemia, MDS myelodysplastic syndrome, CLL chronic lymphatic leukaemia, CML chronic myeloid leukaemia, ALL acute lymphoid leukaemia, NHL non-Hodgkin's lymphoma, HLA human leucocyte antigen, MRD matched related donor, MUD matched unrelated donor, mMUD mismatched unrelated donor, GvHD graft-versus-host disease, CMV cytomegalovirus

seropositivity of the patient defined a 'high-risk' situation. The severity of acute and chronic GvHD was classified according to previously published consensus statements (Przepiorka et al. 1995; Filipovich et al. 2005).

Quantification of cell numbers

Absolute numbers of neutrophils and monocytes in peripheral blood were calculated using total WBC counts and the proportion of each cell type identified in the differential hemogram. Subsequently, the distinct subsets of monocytes were determined in consideration of the percentage CD14⁺⁺/CD16[–] and CD14⁺⁺/CD16⁺ in a separate two-colour flow cytometry analysis of whole blood after lysis of erythrocytes (Fig. 1B). Monoclonal antibodies (CD14-APC and CD16-PE) as well as the corresponding

isotype controls were obtained from Becton–Dickinson (Heidelberg, Germany).

Measurement of *E. coli* phagocytosis

The phagocytic capacity of neutrophils and monocytes was determined using the Phagotest[®] assay (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Germany) according to the manufacturer's instructions with some modifications. Briefly, 200 μ l of freshly drawn heparinized whole blood was aliquoted for each test on the bottom of a 14-ml falcon tube and cooled down to 0°C in an ice bath for 10 min. Subsequently, 20 μ l of opsonized FITC-labelled *E. coli* was added to each sample and incubated at 37°C for 10 min. Phagocytosis was stopped by adding 200 μ l of quenching solution followed by two washing steps. After this, erythrocytes were lysed at room temperature for 20 min and each sample was aliquoted and stained with APC-conjugated isotype control or CD14-APC, respectively. All analyses included control samples that were not incubated with FITC-labelled *E. coli* in order to assess the autofluorescence defining negative cells of the test samples. Multiparameter flow cytometry was used for measurement of phagocytosis (Fig. 1A). The monocyte population was identified by immunological gating (CD14-APC versus SSC) while neutrophils were gated according to its scatter characteristics. The uptake of *E. coli* was quantified by green fluorescence (FITC). All samples were analysed as duplicates.

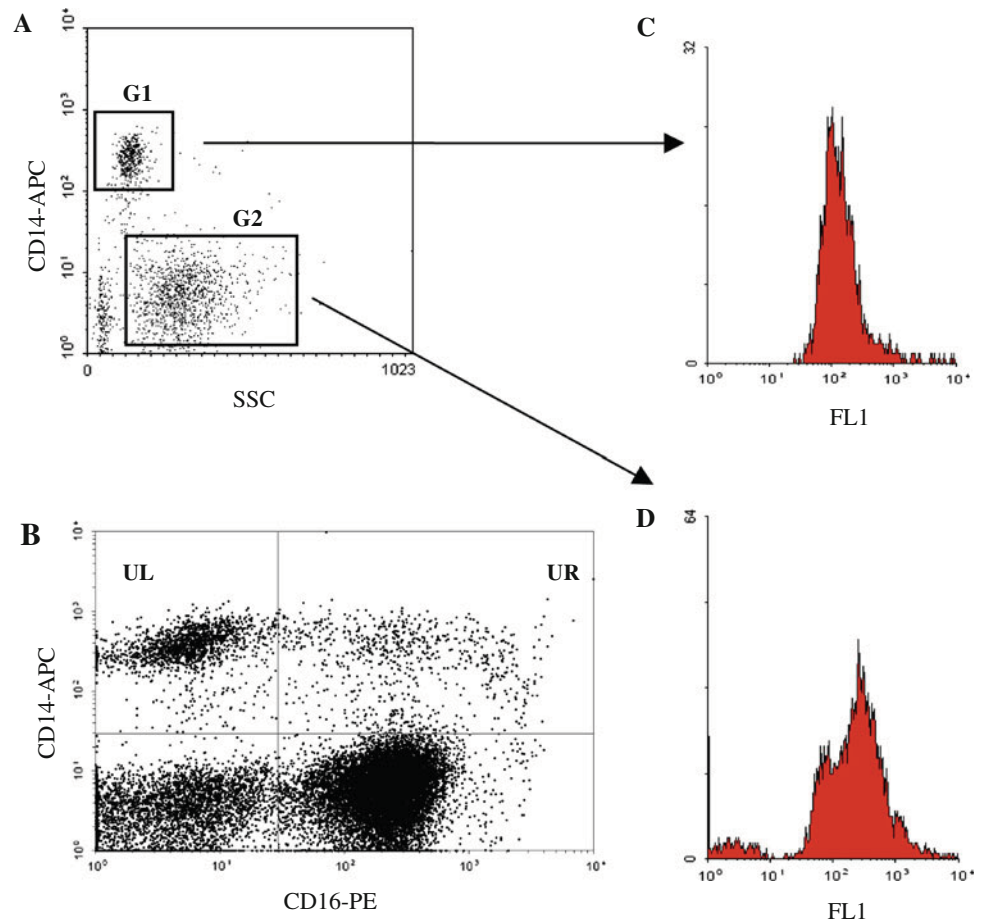
Analysis of oxidative burst

Measurement of oxidative burst was performed using the Phagoburst[®] assay kit (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Germany) that enables the evaluation of phagocytosis and oxidative burst. In detail, 200 μ l of heparinized whole blood was pipetted for each sample and incubated with 20 μ l washing solution (negative control), PMA, f-MLP or a suspension of opsonized *E. coli* at 37°C for 10 min. Subsequently, 40 μ l of freshly solved nonfluorescent substrate DHR (dihydrorhodamine-123) was added to each samples and incubated at 37°C for additional 10 min. All reactions were stopped with 2 ml lysing solution and were washed with 3 ml lysing solution. Staining of CD14 was performed as described above. Oxidative burst was analysed by flow cytometry of green fluorescence resulting from oxidative conversion of DHR to a fluorescent product. All determinations were performed as duplicates.

Data description and statistical analyses

Flow cytometry analyses defined two subgroups of FITC-positive cells. In detail, all leucocytes with a fluorescence

Fig. 1 Overview of methods—**a** dot-plot presentation (SSC vs. CD14) identifying monocytes (G1, gate 1) and neutrophils (G2, gate 2). Functional assays (Phagotest[®] and Phagoburst[®]) of leucocyte subpopulations were performed by separate analysis according to immunological gating (**c** and **d**, respectively). **b**. Double-staining of leucocytes analysing CD14++CD16– (UL, *upper left*) and CD14+CD16+ (UR, *upper right*) monocyte subpopulations. For further details, see also section ‘Patients and methods’



intensity higher than one log-range above the corresponding control sample were defined as ‘high positive’. In contrast, ‘total positive’ cells represent all leucocytes that were FITC-positive in consideration of samples that were not incubated with *E. coli* or DHR, respectively. Statistical analyses were performed with the Statistical Program for Social Science (SPSS, Chicago, IL, USA). Differences between groups were assessed using Student’s *t*-test. Results were considered statistically significant in case of $P \leq 0.05$.

Results

Time-dependent phagocytosis of *E. coli*

The capability of neutrophils and monocytes was analysed at three different time points: day +30, day +60 and day +90, respectively. The mean values of the percentage of positive cells defined by *E. coli* uptake are indicated in Table 2. It can be demonstrated that especially neutrophils undergo a rapid functional reconstitution measured by phagocytosis of bacteria. In detail, about ninety per cent of neutrophils were able to phagocyte *E. coli* on day +30.

Furthermore, almost all neutrophils were high positive reflecting a strong uptake of opsonized bacteria.

Analysis of monocytes revealed a similar time-dependent pattern after allogeneic PBSCT. Thus, the phagocytic capacity of monocytes did also recovered quickly as demonstrated by a high proportion of *E. coli*-positive cells. Nevertheless, there was a slight increase of total positive cells between day +30 and day +90: 68% vs. 84%, respectively (not significant). The observation that a majority of cells were even high positive in this assay correlates with the results for neutrophils as described above.

The data presented in Table 2 also demonstrate a broad range of positive cells identified in our patients that reflects a high variety of phagocytosis after allogeneic stem cell transplantation.

Recovery of oxidative burst activity

Table 3 summarises the quantitative analyses of oxidative burst activity of neutrophils and monocytes after allogeneic PBSCT in a time-dependent manner. It can be shown that the responsiveness of monocytes following stimulation with PMA is still quite impaired until day +60 while a

Table 2 Time course of phagocytic activity of neutrophils and monocytes

	Day +30		Day +60		Day +90		
	Neutrophils <i>n</i> = 30	Monocytes <i>n</i> = 23	Neutrophils <i>n</i> = 20	Monocytes <i>n</i> = 15	Neutrophils <i>n</i> = 14	Monocytes <i>n</i> = 11	
<i>E. coli</i>							
Total positive (%; range)	90.0 (1–99)	68.4 (0–96)	93.5 (2–98)	78.7 (0–96)	91.8 (1–96)	84.3 (2–97)	n.s.
High positive (%; range)	83.7 (1–96)	53.5 (0–94)	86.3 (1–98)	61.2 (5–94)	82.5 (1–95)	69.0 (2–94)	n.s.

Data represent median values of total and high positive cells

Table 3 Time-dependent oxidative burst of neutrophils and monocytes

	Day +30		Day +60		Day +90		
	Neutrophils <i>n</i> = 30	Monocytes <i>n</i> = 23	Neutrophils <i>n</i> = 20	Monocytes <i>n</i> = 15	Neutrophils <i>n</i> = 14	Monocytes <i>n</i> = 11	
PMA							
Total positive (%)	53.4	31.1	76.5	35.2	48.6	76.8	day +60 vs. +90 <i>P</i> = 0.017
High positive (%)	29.3	2.5	31.4	2.4	25.6	6.7	n.s.
fMLP							
Total positive (%)	1.3	14.4	1.6	15.4	3.2	25.5	n.s.
High positive (%)	0.03	0.04	0.1	0.2	0.1	0.3	n.s.
<i>E. coli</i>							
Total positive (%)	38.7	43.8	61.9	54.6	66.3	67.1	day +30 vs. +60 <i>P</i> = 0.01
High positive (%)	13.3	8.7	16.8	13.8	5.4	6.7	day +60 vs. +90 <i>P</i> = 0.056

Data represent median values of total and high positive cells

twofold increase of oxidative burst positive cells can be observed on day +90 (35% vs. 77%, *P* = 0.017).

In contrast, the ability of both neutrophils and monocytes to induce oxidative burst after stimulation with the peptide f-MLP did not change significantly between day +30 and +90.

In addition, a reduced functional capacity of neutrophils concerning oxidative burst induction after *E. coli* uptake early after engraftment can be shown. Furthermore, this lack of neutrophil function is no longer apparent on day +60 as demonstrated by consecutive analyses (39% vs. 62%, *P* = 0.01). Interestingly, the comparison of high positive cells (day +60 vs. day +90) suggests a decrease with respect to neutrophils after oxidative burst stimulation with *E. coli* (17% vs. 5%, *P* = 0.056). The variety of the data describing the range of each analysis was comparable with that presented in Table 2.

Reconstitution of distinct monocyte subpopulations

In addition to the absolute numbers of peripheral blood monocytes at different time points following allogeneic

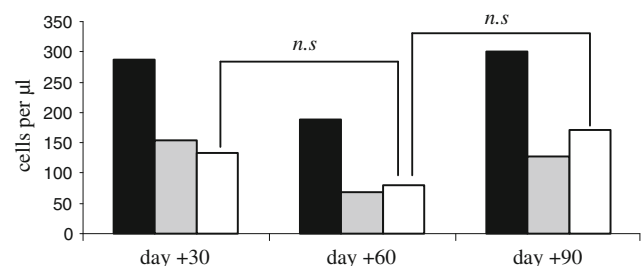


Fig. 2 Reconstitution of monocyte subpopulations after allogeneic PBSCT (black bars indicate total monocytes; grey bars CD14++CD16–; white bars CD14++CD16+ monocytes)

PBSCT, the distribution of CD14++CD16– and CD14++CD16+ cells representing distinct monocyte subpopulations were assessed by means of two-colour flow cytometry (Fig. 2). There was a rapid reconstitution of overall monocytes already at day +30 without any significant change compared to both time points that were analysed later. In addition, the same observation was made with respect to the monocyte subpopulations CD14++CD16– and CD14++CD16+, respectively. The

percentage of CD14+CD16+ was much higher than in healthy volunteers. In detail, at day +60 and day +90, the ratio of CD14+CD16+ and CD14++CD16– monocytes was >1.

Association between monocyte reconstitution and GvHD

The next question to be addressed was if there is a correlation between the reconstitution of monocyte subpopulations and the occurrence of either severe acute GvHD (grades II–IV) or of chronic GvHD. Neither the absolute numbers of monocyte subpopulations nor any ratio of these monocyte subsets calculated on day +30 or day +60, respectively, could demonstrate a correlation with the incidence or severity of acute GvHD (data not shown).

A descriptive analysis of absolute CD14+CD16+ counts was performed with respect to the clinical follow-up of chronic GvHD in these patients. In detail, a serial ranking of absolute CD14+CD16+ cells as measured on day +90 was assessed and patients in the lower third were compared with those patients within the upper third of absolute CD14+CD16+ counts (Table 4). Interestingly, all patients with low absolute CD14+CD16+ counts developed chronic GvHD including three patients with extended GvHD. Surprisingly, all patients with extended chronic GvHD had a donor without a HLA mismatch constellation. In contrast, within the small subgroup of patients with the highest CD14+CD16+ values, four out of six patients did not demonstrate a chronic GvHD in the clinical follow-up. Furthermore, no extensive GvHD was observed in this subgroup while one of the patients with limited chronic GvHD had a donor with a double HLA mismatch.

Discussion

The aim of this study was to analyse the time-dependent reconstitution of distinct functional aspects of neutrophils and monocytes in patients who underwent allogeneic PBSCT. These data reflect one of the first comprehensive investigations on the functional recovery of the innate immune system including an assessment of different functions after allogeneic PBSCT. The study presented here analysed distinct functional aspects of neutrophils and monocytes with the focus on the uptake of *E. coli* and subsequent capacity of oxidative burst at different time points following stem cell transplantation. Furthermore, the recovery of different subsets of monocytes in patients receiving allogeneic PBSCT was investigated.

It can be demonstrated that the functional reconstitution of *E. coli* phagocytosis occurs rapidly for both neutrophils and monocytes after engraftment of peripheral blood stem cells. Thus, a normal capacity to phagocyte bacteria can be documented on day +30 as well as at the consecutive time points investigated. These data agree with results previously published by Miyagawa and Klingemann in patients after allogeneic BMT. Thus, a rapid reconstitution of the phagocytic capacity can be confirmed in the setting of allogeneic PBSCT.

In accordance with previously published observations, an impaired capability of neutrophils to induce oxidative burst after ingestion of *E. coli* shortly after engraftment can be shown as measured on day +30. In addition, there is a significant increase of the percentage of neutrophils that are positive in the oxidative burst assay on day +60. This reflects a normalization of neutrophil function within the second month after allogeneic PBSCT.

Furthermore, a distinct functional reconstitution of monocytes can be demonstrated. In detail, there was a

Table 4 Association between absolute CD14+CD16+ counts on day +90 and the occurrence of chronic GvHD (*n* = 18)

Patient ID	Rank	Absolute counts of CD14+CD16+ (per µl)	Chronic GvHD	Comment
27	1	0	Limited	Relapse
16	2	11	Limited	MUD
26	3	51	Extensive	MUD
21	4	70	Extensive	MUD
2	5	72	Limited	MUD
8	6	113	Extensive	MUD
23	13	279	No	MRD
12	14	284	No	MUD
11	15	291	No	MUD
5	16	318	No	MUD
19	17	365	Limited	MRD
9	18	505	Limited	mMUD (A + C)

MUD matched unrelated donor,
MRD matched related donor,
mMUD mismatched unrelated donor

significant increase of monocytes tested positive for oxidative burst activity following incubation with PMA. In contrast, analyses of monocytes showed a faster functional reconstitution with respect to its capability of oxidative burst after exposure with *E. coli*. Thus, the full responsiveness towards the high stimulus PMA seems to be delayed. The biological important oxidative burst induced by *E. coli* has been rapidly and fully reconstituted on day +30.

The data evaluating the induction of oxidative burst following incubation with f-MLP did not reveal a time-dependent change of this functional capacity. Similar results were obtained for neutrophils and monocytes in patients after allogeneic PBSCT. Nevertheless, absolute values suggest an increased responsiveness of monocytes on day +90 after stem cell transplantation.

A potential correlation between high absolute numbers of CD14+CD16+ monocytes and the absence of chronic GvHD was observed. Of course, the small numbers of patients in this study have to be considered and therefore, these data are preliminary. Nevertheless, this observation allows to hypothesise about a preventive character of CD14+CD16+ monocytes for severe chronic GvHD. The interpretation of this observation seems to be rather difficult. The CD14+CD16+ monocytes are attributed to reflect the monocyte subpopulation with the highest production of proinflammatory cytokines like tumour necrosis factor (Belge et al. 2002). An increase of CD14+CD16+ monocytes had been described in severe infections, autoimmune disease or carcinomas (Ziegler-Heitbrock 1996; Kawanaka et al. 2002; Saleh et al. 1995). So far, profound data on a potential regulatory role of CD14+CD16+ cells that might explain a negative impact on such complex immune processes as GvHD have not been published.

With respect to the small cohort of patients in this study, the distribution of CD14+CD16+ cells and the occurrence of severe chronic GvHD might be a result of coincidence. Furthermore, it cannot be excluded that the low absolute CD14+CD16+ counts reflect only an epiphenomenon as a result of a higher rate of prolonged treatment with glucocorticoids (Fingerle-Rowson et al. 1998). Thus, the reconstitution of distinct subsets of monocytes following allogeneic stem cell transplantation should be evaluated in a prospective manner.

In conclusion, the reconstitution of neutrophil and monocyte functions in the early period after allogeneic PBSCT differs in terms of both phagocytosis and oxidative burst. In addition, the velocity of functional recovery depends on the stimulus used for oxidative burst analysis. Furthermore, it might be hypothesised that high numbers of CD16+CD14+ monocytes correlate with a reduced risk of chronic GvHD.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the Deutsche Krebshilfe foundation (Az. 108868).

Conflict of interest There are no conflicts of interest for Sebastian Scholl.

References

- Ancuta P, Weiss L, Haeflner-Cavaillon N (2000) CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 30:1872–1883
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002) The proinflammatory CD14+CD16+ DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168:3536–3542
- Dayyani F, Joeinig A, Ziegler-Heitbrock L, Schmidmaier R, Straka C, Emmerich B, Meinhardt G (2004) Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD14+CD16+ monocytes in patients with myeloma and lymphoma. *J Leukoc Biol* 75:207–213
- Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. *N Engl J Med* 343:37–49
- Diacovich L, Gorvel JP (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 8:117–128
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:945–956
- Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW (1998) Selective depletion of CD14+CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112:501–506
- George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K (2010) Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis* 12:322–329
- Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327:291–295
- Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H (2002) CD14+CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 46:2578–2586
- Kobayashi SD, DeLeo FR (2009) Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1:309–333
- Krause SW, Rothe G, Gnad M, Reichle A, Andreesen A (2003) Blood leukocyte subsets and cytokine profile after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Ann Haematol* 82:628–636
- Miyagawa B, Klingemann HG (1997) Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J Lab Clin Med* 129:634–637
- Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H (1996) Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88:2775–2779
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527–2534
- Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED (1995) 1994 Consensus conference on acute GvHD grading. *Bone Marrow Transplant* 15:825–828

- Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA (1993) Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 12:469–475
- Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH (1995) CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colonystimulating factor. *Blood* 85:2910–2917
- Scholl S, Hanke M, Höffken K, Sayer HG (2007) Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Cancer Res Clin Oncol* 133:411–415
- Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kaelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldar A, Or R (1998) Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. *Blood* 91:756–763
- Van den Broek PJ, van den Meer JW, Leijh PC, Zwaan F, van den Barselaar M, van Furth R (1981) Functions of granulocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Blut* 42:253–257
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44–49
- Volk J, Kleine HD, Buthmann U, Freund M (2000) Oxidative burst measurement in patients treated with cytostatics. Influence of G-CSF and role as a prognostic factor. *Ann Haematol* 79:187–197
- Yona S, Jung S (2010) Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17:53–59
- Ziegler-Heitbrock HWL (1996) Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. *Immunol Today* 17:424–428
- Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelter F, Schütt C, Passlick B, Pforte A (1993) The novel subset of CD14 +/CD16+ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23:2053–2058

4.2 Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Scholl Sebastian, Hanke Maraike, Höffken Klaus, Sayer Herbert G.; Journal of Cancer Research and Clinical Oncology; 133(6):411-415; 2007

Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation

S. Scholl · M. Hanke · K. Höffken · H. G. Sayer

Received: 11 October 2006 / Revised: 13 December 2006 / Accepted: 19 December 2006 / Published online: 24 January 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract

Purpose The study investigated in detail neutrophil functions shortly after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT).

Methods Different functions of neutrophils in 14 patients who received allogeneic PBSCT were investigated. The migratory capacity as well as the ability to induce oxidative burst following stimulation with either Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), the chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (f-MLP) or opsonized *Escherichia coli* was analysed after engraftment (between day +30 and +40) and compared with the results obtained from healthy volunteers.

Results There are no differences in terms of the migratory capacity ($P = 0.17$), as well as regarding the oxidative burst after incubation with PMA ($P = 0.08$) or f-MLP ($P = 0.06$), compared with healthy men. In contrast, the capacity of neutrophils to induce oxidative burst following stimulation with *E. coli* is highly impaired ($P = 0.0001$) in patients shortly after engraftment.

Conclusion The recovery of neutrophils after allogeneic PBSCT is not only influenced by the varying time of engraftment, but also represents a process that differs in distinct biological functions compared to normal granulopoieses.

Keywords Neutrophils · Allogeneic PBSCT · Oxidative burst · Migration

Abbreviations

PBSCT Peripheral blood stem cell transplantation
PMA Phorbol-12-myristate-13-acetate
f-MLP N-formyl-Met-Leu-Phe
BMT Bone marrow transplantation

Introduction

Many reports concerning the reconstitution of different lymphocyte subsets following allogeneic bone marrow transplantation (BMT) or peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) have been published. So far, a detailed knowledge about the impact of various aspects on lymphocyte recovery exists, e.g. stem cell source, pretransplant conditioning therapy, extent of acute graft-versus-host disease (GvHD), occurrence of cytomegalovirus (CMV) activation (Ottinger et al. 1996; Roberts et al. 1993).

In addition, several biological functions of such important myeloid derived cells like neutrophils and monocytes play a pivotal role in the immune defence against bacterial and fungal infections. The functional capacity of this innate immune system is of special importance in patients who received myelotoxic chemotherapy or who underwent autologous or even allogeneic BMT or PBSCT (Volk et al. 2000; Dayyani et al. 2003; Krause et al. 2003).

In the era of BMT, the functional impairment of neutrophils after allogeneic transplantation has been reported. In detail, Van den Broek et al. described a normal phagocytosis while they observed a reduced intracellular killing in the early period after BMT (Van den Broek et al. 1981). In 1997, Miyagawa and Klingemann reported on phagocytosis and oxidative burst

S. Scholl (✉) · M. Hanke · K. Höffken · H. G. Sayer
Department of Internal Medicine II (Oncology and Hematology), Friedrich Schiller University,
Erlanger Allee 101, 07740 Jena, Germany
e-mail: sebastian.scholl@med.uni-jena.de

activity of leukocytes in patients who underwent stem cell transplantation. This work demonstrated in accordance an unaffected phagocytosis, while they observed an impaired oxidative burst (Miyagawa and Klingemann 1997).

To our knowledge, until now, no investigations on the functional recovery of neutrophils including an assessment of the migratory capacity after allogeneic stem cell transplantation have been followed. The study presented here analysed different functional aspects of neutrophils after allogeneic stem cell transplantation. We report on a rapid reconstitution of the migratory capacity and the ability to induce oxidative burst, while the process of phagocytosis is still significantly reduced.

Patients and methods

In this study, 14 patients (see Table 1) who had undergone allogeneic PBSCT between May 2002 and July 2003 were included. Informed consent was provided by all investigated patients. The ages of the four healthy volunteers varied between 28 and 38 years.

Preparative regimens and prophylaxis against graft-versus-host disease

Most patients (7/14) received hyperfractionated total body irradiation (TBI, 12 Gy) and cyclophosphamide (60 mg/kg at day −3 and −2), while the protocols of patients treated with a reduced TBI (8 Gy) regimen were supplemented with fludarabine or antithymocyte globulin (ATG). Five patients received a reduced intensity conditioning regimen consisting of fludarabine (30 mg/m², day −10 to −5), busulfan (4 mg/kg at day −6 and −5) and ATG (10 mg/kg, day −4 to −1). Two patients were conditioned with a combination of busulfan (4 mg/kg, day −7 to −4) or treosulfan (14 g/m², day −7 to −5), followed by cyclophosphamide (60 mg/kg at day −3 and −2). All patients received cyclosporine A (CSA), starting with 3 mg/kg at day −1, followed by adaptation according to serum level. Patients undergoing a conditioning protocol containing 12 Gy TBI were additionally treated with methotrexate (MTX) on day 1 (15 mg/m²), followed by 10 mg/m² on days 3, 6 and 11. Patients with GvHD risk factors (one HLA mismatch or unrelated donor) were additionally treated with mycophenolate mofetil (MMF), beginning on day +10. All patients received granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) subcutaneously, at a dose of 5 µg/kg body weight from day +1 until stable recovery of leukocytes.

Table 1 Patients' characteristics

Patients' characteristics	n = 14
Sex (female/male) %	8/6 (57/43)
Disease, cases/%	
AML/MDS/CML	7(50.0)
ALL/NHL	7(50.0)
Age at transplantation (years)	42
Median age (range)	(20–58)
Donor, cases/%	
HLA ident	5(35.7)
MUD	8(57.1)
HLA mismatch	1(7.1)
CD34 content (×10 ⁶ per kg)	8.0
Median (range)	(1.9–8.0)
Conditioning, cases/%	
TBI (12 Gy)/cyclophosphamide	4(28.6)
Busulfan/cyclophosphamide	1(7.1)
Treosulfan/cyclophosphamide	1(7.1)
TBI (8 Gy)/cyclophosphamide/fludarabine	2(14.2)
TBI (8 Gy)/cyclophosphamide/ATG	1(7.1)
Fludarabine/busulfan/ATG	5(35.7)
GvHD prophylaxis, cases/%	
CSA alone	3(21.3)
CSA/methotrexate	2(14.2)
CSA/MMF	7(50.0)
CSA/methotrexate/MMF	2(14.2)
Acute GvHD	
No and grade I GvHD	8(57.1)
GvHD grades II–IV	6(42.9)

AML indicates acute myeloid leukaemia, *MDS* myelodysplastic syndrome, *CML* chronic myeloid leukaemia, *ALL* acute lymphoid leukaemia, *NHL* non-Hodgkin's lymphoma, *HLA* human leukocyte antigen, *MUD* matched unrelated donor, *TBI* total body irradiation, *ATG* antithymocyte globulin, *GvHD* graft-versus-host disease, *CSA* cyclosporine A, *MMF* mycophenolate mofetil, *CMV* cytomegalovirus

Measurement of oxidative burst in neutrophils

The determination of oxidative burst was performed using the Phagoburst® assay kit obtained from ORPEGEN Pharma (Heidelberg, Germany), according to the manufacturers instructions. This assay allows the combined evaluation of phagocytosis and oxidative burst. In detail, 100 µl of freshly drawn heparinized whole blood was pipetted into each vial prior to incubation with either 20 µl washing solution representing the negative control or stimulation with the positive control represented by Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), the chemotactic peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (f-MLP) or a suspension containing opsonized *Escherichia coli* (10 min at 37°C). After this, 20 µl of substrate solution containing dihydrorhodamine-123 (DHR) was added to each tube and the samples were incubated for an additional 10 min at 37°C. All reactions were stopped with 2 ml lysing solution (20 min at room temperature). The samples were washed with

3 ml lysing solution after centrifugation and stained with DNA staining solution (propidium iodide) at 4°C in the dark prior to FACS analyses (see below). All determinations were performed as duplicates.

Determination of neutrophil migration

The migratory capacity of neutrophils was determined using the Migratest® transwell assay system purchased from ORPEGEN Pharma (Heidelberg, Germany). Briefly, 1 ml of freshly drawn heparinized whole blood was loaded onto 1 ml Ficoll's reagent and incubated for 40 min at room temperature, before 500 µl of leukocyte enriched plasma ('leukocytes') could be collected. In the meanwhile, the migration assay was prepared by pipetting 350 µl of incubation buffer (control) or the f-MLP containing buffer in the lower chamber. For each patient or healthy volunteer, we performed double determinations for both the control reaction and the migration assay with f-MLP. After this, 100 µl of leukocytes were loaded onto each inserted membrane and incubated for 30 min at 30°C. The membranes were removed and the content of each lower chamber was collected prior to staining (LECAM-1) and addition of a defined counting solution containing standardized beads (10 min in the dark). In parallel, 20 µl of leukocytes were diluted with 330 µl incubation buffer and supplemented with staining and counting solution as well. All determinations were performed as duplicates as well.

FACS analyses and data description

The Phagoburst® assay was based on the measurement of the conversion of DHR to a green fluorescent dye (FL-1) by reactive oxygen species (ROS). The quality of each sample including its content of neutrophils was checked in the scatter blot (FSC/SSC). After this, a SSC/FL-1 dot blot was created to analyse the primary data. While there was nearly no conversion of DHR in the control reactions, different amounts of neutrophils with a strong green fluorescence indicating the oxidative burst could be detected after treatment with PMA, f-MLP or *E. coli* (see Fig. 1a).

A different algorithm was used for analyses of FACS data obtained in the Migratest® assay. The scatter blot (FSC/SSC) was used to gate both the counting beads and the migrated neutrophils (high SSC). After this, these populations were analysed in a secondary dot blot (SSC/FL-2), while beads and neutrophils were counted in separate gates. The sample containing 20 µl of leukocytes allowed the calculation of the individual

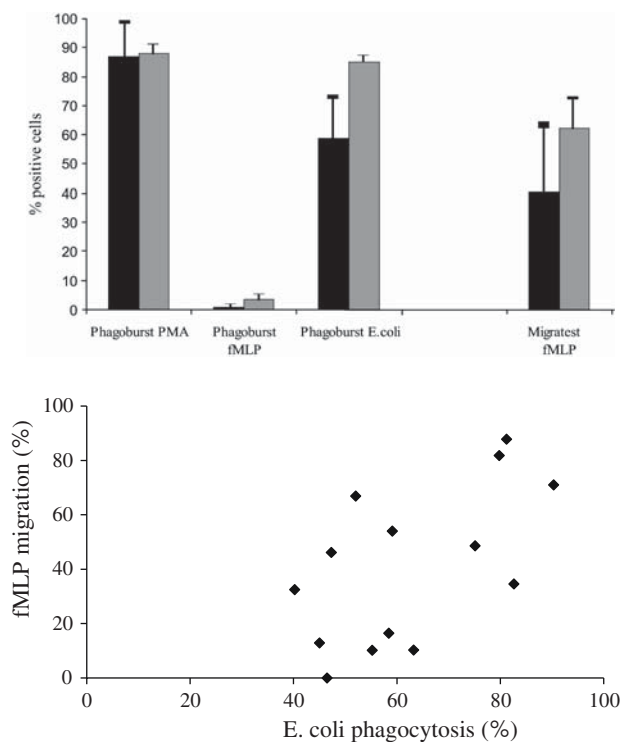


Fig. 1 Oxidative burst and migratory capacity of neutrophils after allogeneic PBST ($n = 14$, black bars) compared to healthy volunteers ($n = 4$, grey bars) is shown in the upper part. Direct comparison of oxidative burst following the incubation of neutrophils with opsonized bacteria (*Escherichia coli*) and the migratory capacity of neutrophils for each patient (coefficient of correlation 0.54) is demonstrated in the lower part

ratio between neutrophils and beads. Thus, a standardization of a certain number of beads enabled a quantification of migrated cells. The down-regulation of the adhesion molecule LECAM-1 represents an additional marker for neutrophil activation during migration induced by f-MLP.

Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. The results were considered statistically significant in the case of $P \leq 0.05$.

Results

Recovery of migratory capacity after allogeneic PBST

We investigated the ability of neutrophils to migrate across a transwell membrane dependent on the chemotactic peptide f-MLP. All analyses were performed after engraftment between day +30 and +40 in patients who underwent allogeneic PBST. We can show that a reconstitution of neutrophil migratory capacity after allogeneic PBST can be observed at this time interval

(Fig. 1, upper part). In detail, the different values of migrated neutrophils between healthy volunteers (median 62.2%) and the results that were obtained from patient samples (median 40.4%) were not significant ($P = 0.17$).

Analyses of phagocytosis and oxidative burst activity

Interestingly, there was no significant difference between healthy volunteers and patient samples in terms of the oxidative burst activity following stimulation with f-MLP (median 3.5 vs. 0.8, $P = 0.06$) and PMA (median 87.9 vs. 86.9, $P = 0.08$). In contrast, we can demonstrate a high significant difference in terms of oxidative burst activity between healthy persons and patients after allogeneic PBSCT, following incubation of neutrophils with opsonized *E. coli* (median 85.0 vs. 58.8, $P = 0.0001$, Fig. 1, upper part).

Figure 1 (lower part) further demonstrates that there is no correlation between the functional aspects of phagocytosis/oxidative burst and migration in the investigated patients (coefficient of correlation 0.54). Two subgroups of patients can be separated after stimulation of neutrophils with *E. coli* (less versus more than 70% of positive cells), while there are some patients with an intermediate migratory capacity within both subgroups.

Influence of acute GvHD and extent of conditioning regimen on neutrophil function

We further analysed whether patients with severe acute GvHD (grades II–IV) offer differences in terms of their neutrophil function compared with patients who developed no GvHD or only grade I acute GvHD until measurement of neutrophil function. We performed an additional subgroup analysis in order to compare patients who underwent the dose-reduced conditioning regimen with the patients who received a conventional conditioning protocol prior to allogeneic PBSCT. In our patients, neither the incidence of acute GvHD nor the extent of the conditioning therapy influenced the functional capacity of neutrophils between day +30 and +40. In detail, there was no significant difference in oxidative burst following incubation with *E. coli* and in the migration assay between patients with no or grade I acute GvHD and patients who developed grades II–IV acute GvHD ($P = 0.37$ and $P = 0.30$, respectively). A similar result was obtained on comparing patients who received the dose-reduced regimen with the patients who underwent allogeneic PBSCT after a myeloablative protocol ($P = 0.33$ and 0.30 , respectively).

Discussion

We can demonstrate that the migratory capacity of neutrophils as well as the capability to induce oxidative burst reconstitute rapidly after allogeneic PBSCT. In contrast, with respect to the high significant differences after incubation with *E. coli* (median 85.0 vs. 58.8, $P = 0.0001$), the process of phagocytosis is still significantly reduced. This indicates a functional impairment that is presumably focused on the process of phagocytosis itself. Our data comparing the induction of oxidative burst following incubation with either PMA or f-MLP in patients after PBSCT and healthy volunteers suggest that the intracellular processes mediating the oxidative burst do not seem to be impaired. Nevertheless, oxidative burst following incubation with f-MLP indicates a trend and should be investigated in larger sample groups.

Our data support the idea that a functional impairment of phagocytosis remains in the early period after stem cell transplantation. This interpretation is contradictory to previous results as described by Miyagawa and Klingemann, who reported on a functional impairment in terms of phagocytosis directly measured by the reduced ingestion of bacteria (Miyagawa and Klingemann 1997). This study demonstrated that even after allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells, including the administration of G-CSF, one fundamental part of the innate immune system, i.e. the defence of bacteria is limited.

Our data let us further hypothesize that there is no impact of severity of acute GvHD or the extent of the conditioning protocol (dose-reduced vs. conventional) on the reconstitution of such fundamental neutrophil functions as migration and oxidative burst. In consideration of the low numbers of patients within the formed subgroups, we are aware that these results are preliminary. In addition, the lack of influence of the severity of GvHD, as well as of the extent of the applied conditioning regimen, might be due to the small sample size in this study.

In conclusion, the recovery of neutrophils shortly after allogeneic PBSCT varies, by different neutrophil counts, quantitatively, depending on the onset of engraftment and the capacity of the reconstituting bone marrow. Furthermore, neutrophil recovery in the early period following stem cell transplantation is a subtle process in terms of functional aspects. The reconstitution of the migratory capacity of neutrophils is distinct from the recovery of a sufficient defence against bacteria.

Acknowledgment We especially thank A. Markusch for her excellent help in the analyses of patient data.

References

- Dayyani F, Joeinig A, Ziegler-Heitbrock L, et al (2003) Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD14+CD16+ monocytes in patients with myeloma and lymphoma. *J Leukoc Biol* 75:207–213
- Kasper C, Sayer HG, Mügge LO, et al (2004) Combined standard graft-versus-host disease (GvHD) prophylaxis with mycophenolate mofetil (MMF) in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 33:65–69
- Krause SW, Rothe G, Gnad M, et al (2003) Blood leukocyte subsets and cytokine profile after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Ann Haematol* 83:628–636
- Miyagawa B, Klingemann HG (1997) Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J Lab Clin Med* 129:634–637
- Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B et al (1996) Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88:2775–2779
- Roberts MM, To LB, Gillis D et al (1993) Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 12:469–475
- Van den Broek PJ, van den Meer JW, Leijh PC et al (1981) Functions of granulocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Blut* 42:253–257
- Volk J, Kleine HD, Buthmann U, Freund M (2000) Oxidative burst measurement in patients treated with cytostatics. Influence of G-CSF and role as a prognostic factor. *Ann Haematol* 79:187–197

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Verlauf der Rekonstitution bestimmter funktioneller Aspekte neutrophiler Granulozyten und Monozyten von Patienten nach allogener peripherer hämatopoetischer Stammzelltransplantation untersucht.

Bisher gibt es eine große Anzahl von Untersuchungen der Lymphozytenpopulation nach allogener KMT oder PBSCT. Hier wurden genauestens die verschiedenen Einflussfaktoren wie Stammzellquelle, Konditionierungsregime, Auftreten infektiöser Komplikationen (z.B. CMV-Reaktivierung) und die Entstehung einer akuten und chronischen GvHD auf die Funktionsfähigkeit von Lymphozyten untersucht und beschrieben (Ottinger et al. 1996; Roberts et al. 1993). In verschiedenen Untersuchungen wurden ebenfalls die Funktionalität des angeborenen Immunsystems und dessen Bedeutung für die frühe Phase nach Stammzelltransplantation untersucht (Volk et al. 2000; Dayyani et al. 2003; Krause et al. 2003).

Van den Broek beschreibt eine rasche Rekonstitution der Phagozytosefähigkeit mit noch ausbleibender Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ in der Frühphase nach Transplantation. Ähnliche Ergebnisse mit Nachweis einer unbeeinträchtigten Phagozytose aber noch ineffektivem „oxidativen Burst“ der neutrophilen Granulozyten erzielten Miyagawa und Klingemann (Van den Broek et al. 1981; Miyagawa, Klingemann 1997).

Die Ziele des ersten Abschnittes bestanden in der Analyse der Migrationsfähigkeit und der Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ von neutrophilen Granulozyten. Die Untersuchungen erfolgten an 14 Patienten im Alter von 28-38 Jahren zwischen den Tagen +30 und +40 nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation mittels FACS-Analyse. Die Migrationsfähigkeit wurde mittels des von ORPEGEN Pharma angebotenen Migratest[®] untersucht. Als Stimulus wurde hierbei fMLP verwendet. Als weiterer Marker diente das Adhäsionsmolekül (LECAM-1), welches bei der Migration von Granulozyten nach fMLP-Stimulation herunterreguliert wird.

Es wurde die Migrationsfähigkeit mittels FACS-Analyse im „Scatterplot“ (FSC/SSC) bestimmt. In einem zweiten Schritt konnten die einzelnen Populationen mittels „Dotplot“-Analyse (SSC / FL-2) bestimmt werden.

Zur Untersuchung der Fähigkeit neutrophiler Granulozyten zur Ausführung des „oxidativen Burst“ wurde der Phagoburst® Kit von ORPEGEN Pharma verwendet. Zur Verwendung kam hier heparinisiertes Vollblut. Als Stimulus diente das chemotaktische Peptid fMLP (N-formyl-Met-Leu), als positiv Kontrolle PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) oder es wurden opsonierte *E. coli*-Bakterien verwendet. Dieser erlaubt für den *E. coli*-Ansatz die gleichzeitige Untersuchung der Phagozytose und des „oxidativen Burst“. Die Durchführung des „oxidativen Burst“ wurde mittels Umwandlung von Dihydrorhodamin (DHR) in Rhodamin in der FACS-Analyse (FL-1, grüner Fluoreszenzfarbstoff) gemessen. Die Qualität der Probe und das Vorhandensein neutrophiler Granulozyten wurden zusätzlich mittels „Scatterplot“ überprüft.

Es zeigte sich in Bezug auf die Migrationskapazität (Median 40,4%) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Median 62,2%) kein signifikanter Unterschied ($p = 0,17$). Dieses Ergebnis spiegelt eine rasche Erholung der Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten nach allogener peripherer hämatopoetischer Stammzelltransplantation wider.

Die Erholung der Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ neutrophiler Granulozyten nach allogener PBSCT, im Vergleich zu Zellen gesunder Freiwilliger, zeigte nach Stimulation mit fMLP (Median 3,5% vs. 0,8%; $p = 0,06$) und PMA (Median 87,9 vs. 86,9; $p = 0,08$) keine signifikanten Unterschiede. Dagegen ergab die Stimulation mit opsonierten *E. coli* signifikante Unterschiede zwischen Patientenproben nach erfolgter allogener PBSCT und neutrophilen Granulozyten gesunder Kontrollproben (Median 58,8 vs. 85,0; $p = 0,0001$).

Daraus ergibt sich einen Monat nach allogener PBSCT eine noch reduzierte Fähigkeit zur Durchführung des „oxidativen Burst“ nach Stimulation mit *E. coli*. Anders als bei Miyagawa und Klingemann nach allogener KMT beschrieben, zeigte sich bei normaler Fähigkeit der Partikelaufnahme eine vom Stimulus abhängige Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ (Miyagawa & Klingemann 1997). Die grundlegende Fähigkeit dazu muss aber gegeben sein, da nach Stimulation mit PMA eine normale Fähigkeit zur sauerstoffabhängigen intrazellulären Vernichtung möglich ist. Die Phagozytosefähigkeit ist in dieser Untersuchung früh nach Transplantation ausgeprägt, allerdings bestehen nach Aufnahme eindringender Erreger (Bakterien) noch funktionelle Defizite in der zellulären Abwehr. Daraus gefolgert scheint das

angeborene Immunsystem an Tag +40 nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation noch nicht vollständig regeneriert zu sein.

Ein Zusammenhang zwischen der funktionellen Rekonstitution und dem Auftreten einer akuten GvHD oder dem Konditionierungsregime konnte in dieser Untersuchung nicht gezeigt werden. Allerdings war in diese Untersuchung nur eine begrenzte Anzahl an Patienten eingeschlossen, so dass bei einer größer angelegten Studie durchaus ein Zusammenhang zwischen der funktionellen Rekonstitution und dem Auftreten einer akuten GvHD nachgewiesen werden könnte. Auch ist es durchaus möglich, dass das Konditionierungsregime einen Einfluss auf die funktionelle Rekonstitution neutrophiler Granulozyten ausübt.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurde an Vollblut von 30 Patienten nach allogener PBSCT eine zeitabhängige Funktionsanalyse der neutrophilen Granulozyten und Monozyten durchgeführt. Diese Untersuchung stellt eine der ersten Untersuchungen der Rekonstitution des angeborenen Immunsystems nach allogener PBSCT dar. Bisher vorliegende Untersuchungen zur Rekonstitution und Funktionalität der angeborenen Immunität beschäftigten sich entweder mit Patienten nach allogener KMT (Miygawa & Klingemann 1997) oder nach autologer PBSCT (Dayyani et al. 2003).

Es wurden hierbei erstmals neutrophile Granulozyten und Monozyten sowohl im Hinblick auf ihre Phagozytosefähigkeit als auch auf die Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ an den Tagen +30, +60 und +90 nach allogener PBSCT untersucht. Zusätzlich wurde die Rekonstitution verschiedener Monozytensubpopulationen (CD14++CD16- versus CD14+CD16+) und ihre absoluten Zellzahlen gemessen. Diese sollten hinsichtlich möglicher Korrelationen mit dem eventuellen Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD oder infektiöser Komplikationen untersucht werden.

Die Phagozytose durch polymorphkernige Granulozyten und Monozyten stellt einen der wichtigsten Abwehrmechanismen des Körpers dar. Besonders in Phasen der Immunsuppression und niedriger absoluter Zellzahlen ist diese Eigenschaft zur Abwehr eindringender Organismen von herausragender Bedeutung. Die Phagozytose ist ein in mehrere Schritte gegliederter Prozess: Chemotaxis und Migration, Anlagerung von Partikeln an die Zelloberfläche, die Phagozytose selbst und die intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Prozesse.

Zur Untersuchung des Prozesses der Phagozytose wurde der Kit Phagotest® der Firma ORPEGEN Pharma benutzt. Es wurden heparinisierte Vollblutproben verwendet. Diese wurden in mehreren Inkubationsschritten mit FITC-markierten *E. coli* inkubiert. Der Prozess der Phagozytose wurde mittels Quenching-Lösung gestoppt. Nach erfolgter Erythrozytenlyse wurde die Probe mit einem gegen CD14 gerichteten Antikörper, APC-konjugiert (Allophycocyanin) angefärbt. Um die Autofluoreszenz der Zellen zu ermitteln, wurden jeweils ungefärbte Kontrollen (ohne Hinzugabe FITC-markierter *E. coli*) mitgeführt. Über eine FACS-Analyse wurde die Phagozytosefähigkeit, also die Aufnahme von *E. coli* (FITC-markiert, grüne Fluoreszenz) gemessen. Die Bestimmung der neutrophilen Granulozyten erfolgte über ihre Scattereigenschaften, die der Monozyten über ein immunologischen Gating (CD14-APC vs. SSC).

In dieser Arbeit konnte eine frühe funktionelle Rekonstitution der Phagozytosefähigkeit sowohl für Monozyten als auch für neutrophile Granulozyten nach Inkubation mit *E. coli* gezeigt werden. Bereits an Tag +30 nach allogener PBSCT war diese Fähigkeit genauso ausgeprägt wie in der gesunden Kontrollgruppe und blieb auch im weiteren Verlauf unverändert hoch. Dies legt, ähnlich wie die Datenlage von Miyagawa und Klingemann bei Patienten nach allogener KMT, eine frühe funktionale Rekonstitution der Phagozytosefähigkeit nahe. Daraus lässt sich im Hinblick auf die Rekonstitution der Phagozytosefähigkeit kein gravierender Unterschied zwischen allogener PBSCT und allogener KMT darstellen.

Um die Effektivität der Zellabwehr zu bestimmen, wurde die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten und Monozyten nach Inkorporation von eindringenden Erregern zur sauerstoffabhängigen intrazellulären Vernichtung („oxidativer Burst“) untersucht. Dafür wurde der gleiche Testkit, Phagoburst® der Firma ORPEGEN, wie schon in den Vorarbeiten verwendet. Auch hier wurden den Zellsuspensionen jeweils fMLP, PMA und *E. coli* zugegeben. Für die Ausführung des „oxidativen Burst“ wurde das Substrat Dihydrorhodamin-123 zugesetzt, dessen Umwandlung in Rhodamin die Messung des „oxidativen Burst“ mittels FACS-Analyse ermöglichte. Zusätzlich wurden auch hier die Monozyten für das immunologische „Gating“ mit dem monoklonalen CD14-Antikörper angefärbt. Nach entsprechender Inkubationszeit erfolgte eine quantitative Zellzahlbestimmung mittels Durchflusszytometrie. Hierbei diente fMLP als „low stimulus“. Dies bedeutet, dass nur eine geringe bis keine

Reaktion erwartet wird. Auch kann man diesen Stimulus zur Untersuchung additiver Effekte verwenden. Bei dem als „high stimulus“ verwendeten PMA geht man davon aus, dass bei erhaltener Fähigkeit zum „oxidativen Burst“ dieser durch die jeweiligen Zellen nach Stimulation auch ausgeführt wird. *E. coli* diene als biologischer Stimulus und ist somit den *in vivo* Bedingungen am nächsten.

Es erfolgte ein entsprechendes „Gating“, wobei die Bestimmung der Monozyten erneut über CD14-APC vs. SSC und die der neutrophilen Granulozyten über ihre Scattereigenschaften erfolgte. Aus der statistischen quantitativen Analyse ergaben sich zusätzlich absolute Zellzahlen mit der Fähigkeit zum „oxidativen Burst“.

Es zeigte sich, dass neutrophile Granulozyten nach Stimulation mit *E. coli* eine zunehmende Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ von Tag +30 auf Tag +60 entwickeln, ohne weiteren relevanten Anstieg bis Tag 90. Dies deutet darauf hin, dass - ähnlich wie in den Vorarbeiten gezeigt (Scholl et al. 2007) - neutrophile Granulozyten an Tag +30 eine noch verringerte funktionelle Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ aufweisen. Bis Tag +60 zeigt sich bei dieser Zellpopulation allerdings eine vollständige Rekonstitution dieses Mechanismus.

Interessanterweise zeigte sich nach Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit PMA keine relevante zeitliche Zunahme der Fähigkeit zum „oxidativen Burst“. Im Gegenteil entsprachen die hier gemessenen Werte schon an Tag +30 denen in der Literatur beschriebenen Erwartungswerten gesunder Kontrollen. Daraus folgt eine frühe vollständige Reaktionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten auf PMA post transplantationem. Gründe hierfür könnten unterschiedliche Angriffspunkte der beiden Substrate sein: *E. coli* ist ein partikulärer Stimulus, wohingegen PMA einen Proteinkinase C-Liganden darstellt.

Eine andere Beobachtung konnte bei der Messung des „oxidativen Burst“ von Monozyten gemacht werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Reaktionsfähigkeit der Monozyten nach Inkubation mit PMA an Tag +90 nach allogener PBSCT. Dies zeigt eine noch verringerte Fähigkeit zur Ausführung des „oxidativen Burst“ der Monozyten nach Stimulation mit PMA in den ersten drei Monaten nach allogener PBSCT. Auffällig ist, dass die Fähigkeit der Monozyten zur Ausführung des biologisch bedeutenderen „oxidativen Burst“ nach Stimulation mit *E. coli* bereits früh nach Transplantation (Tag +30) vollständig gegeben ist. Dies lässt den Monozyten eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Abwehr eindringender Erreger nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation zukommen.

Nach Inkubation mit fMLP zeigte sich weder für neutrophile Granulozyten noch für Monozyten eine signifikante, zeitabhängige Änderung der Funktionalität, auch wenn zahlenmäßig ein ansteigender Anteil positiv getesteter Monozyten zwischen Tag +30 und Tag +90 gemessen wurde (14,4% vs. 25,5%; $p = 0,09$).

Zusammenfassend beschreiben diese Daten eine rasche funktionelle Erholung des angeborenen Immunsystems nach allogener PBSCT. Dies korreliert gut mit publizierten Daten zur Immunrekonstitution nach allogener KMT (Miyagawa & Klingemann 1997). Eindringende Partikel bzw. Erreger können bei beiden Therapien früh effektiv bekämpft werden. Wenn auch vor Therapiebeginn bei verschiedenen Grunderkrankungen - wie zum Beispiel dem multiplen Myelom und Lymphomen - leukozytäre Defekte im Sinne einer eingeschränkten Fähigkeit zur Phagozytose und zum „oxidativen Burst“ beschrieben sind, scheint sich diese nach Hochdosischemotherapie und allogener Blutstammzelltransplantation in den ersten Wochen bis Monaten nach Transplantation vollständig zu erholen (Dammacco et al. 1982; Flieger et al. 1988; Mainwaring et al. 1999).

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass nach allogener Blutstammzelltransplantation die Rekonstitution der angeborenen Immunantwort sehr früh im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem wieder hergestellt ist und für die Genese des Patienten eine übergeordnete Bedeutung darstellt.

Seit einigen Jahren ist eine bestimmte Monozytensubpopulation enger in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Diese sollte auch in dieser Arbeit näher untersucht werden. Es handelt sich hierbei um Monozyten, die auf ihrer Oberfläche zusätzlich das Antigen CD16 exprimieren und denen bestimmte Eigenschaften während sowohl akuter als auch chronischer Entzündungsreaktionen zugeschrieben werden. Daher sollten hier die absoluten Zellzahlen dieser Monozytensubpopulation und ihr Verhältnis zu den klassischen Monozyten (CD14++CD16-) an den drei festgelegten Messtagen nach allogener PBSCT untersucht werden. Zusätzlich sollte dieses Ergebnis mit dem klinischen Auftreten einer akuten oder chronischen GvHD korreliert werden.

Es konnten an Tag +30 nach Transplantation deutlich höhere Werte für die CD14+CD16+ Monozyten festgestellt werden. Sowohl an Tag +30 als auch noch an

Tag +60 lag das Verhältnis über 1 und damit deutlich höher als für Normalpersonen beschrieben.

Bei Ottinger et al. ist eine signifikante Erhöhung der Monozyten-Gesamtpopulation in den ersten zwei Monaten nach allogener Stammzelltransplantation beschrieben. Diese Beobachtung wird einerseits auf eine höhere Menge an transplantierten Monozyten nach Spenderstimulation und der Therapie des Transplantatempfängers mit G-CSF zurückgeführt (Ottinger et al. 1996). Die in den ersten zwei Monaten erhöhte „Ratio“ der CD14+CD16+ Monozyten könnte eine Reaktion individueller Reifungsprozesse des neu anwachsenden Immunsystems darstellen. Man geht davon aus, dass es sich bei dieser bestimmten Monozytensubpopulation um Zellen der angeborenen Immunabwehr handelt, die insbesondere in den ersten Monaten nach allogener peripherer Blutstammzelltransplantation eine verstärkte Funktion übernehmen.

Bei der Untersuchung der klinischen Ereignisse im Zusammenhang mit den absoluten Zellzahlen der CD14+CD16+ Monozyten ergab sich eine positive Korrelation hoher absoluter Zellzahlen und dem Ausbleiben einer schweren chronischen GvHD. In dem Bewusstsein der aufgrund der geringen Patientenzahl eingeschränkten Aussagekraft dieses Ergebnisses, scheint jedoch eine hohe CD14+CD16+ Monozytenzahl einen präventiven Charakter in Bezug auf das klinische Auftreten einer chronischen GvHD zu besitzen.

Die Interpretation dieses Ergebnisses fällt allerdings im Hinblick auf das in der Literatur bisher angenommene Erscheinungsbild dieser Zellpopulation schwer. Die CD14+CD16+ Monozyten werden als die Monozytensubpopulation mit der höchsten Rate an Zytokinproduktion, wie zum Beispiel dem TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha) beschrieben (Belge et al. 2002). Hohe Absolutzahlen dieser Zellpopulation wurden insbesondere mit inflammatorischen Prozessen wie schweren Infektionen oder Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. (Saleh et al. 1995; Ziegler-Heitbrock et al. 1996; Kawanaka et al. 2002). Daten zum Verhalten dieser Zellpopulation nach allogener PBSCT und dem Einfluss auf eine GvHD lagen bisher nicht vor.

Bezugnehmend auf die kleine Patientengruppe könnte man nun von einem zufälligen Zusammentreffen dieser Ergebnisse ausgehen. Ebenso wenig lässt sich ein Einfluss einer verlängerten Immunsuppression auf die niedrige CD14+CD16+ Monozyten ausschließen. Beschrieben wurde eine Suppression dieser Monozytensubpopulation

unter der Therapie mit Glucocorticoiden (Fingerle-Rowson et al. 1998). Untersuchungen über den Einfluss der aktuell zum Einsatz kommenden Immunsuppressiva wie Ciclosporin A, Tacrolimus, Methotrexat und Mycophenolat-Mofetil gibt es derzeit nicht.

Um eine zufällige Korrelation dieses Ergebnisses mit eventuell aufgetretenen infektiösen Komplikationen auszuschließen, wurden die den jeweiligen Messtagen zugeordneten Entzündungsparameter (CrP) und klinischen Daten des Patienten bestimmt. Ein Zusammenhang inflammatorischer Geschehen oder auftretende Rezidive der Grunderkrankung konnten aber nicht in direkten Zusammenhang mit den am Tag +90 gemessenen absoluten CD14+CD16+ Monozytenzahlen gebracht werden.

Zusammenfassend wird vorerst die Hypothese eines positiven präventiven Effekts einer hohen CD14+CD16+ Monozytenzahl auf das klinische Ausbleiben einer chronischen GvHD aufgestellt. Zur Untermauerung oder Widerlegung dieser These bedarf es weiterer, größer angelegter Studien. Ein eventuell zu sichernder Einfluss dieser Zellpopulation würde die Pathophysiologie der chronischen GVHD in ein neues Licht rücken und eventuell den Grundstein zu einem therapeutischen Monitoring und einer Therapie dieser Erkrankung auf zellulärer Ebene legen.

6 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte eine rasche Erholung des angeborenen Immunsystems früh nach allogener peripherer Stammzelltransplantation gezeigt werden.

Diese funktionelle Rekonstitution ist abhängig von der Anzahl neutrophiler Granulozyten und Monozyten, vom Zeitpunkt des Engraftments und der individuellen Fähigkeit zur Erholung des Knochenmarks. Infektiöse Komplikationen, intensive vorangegangene Chemotherapien und Komorbiditäten erschweren diese Prozesse.

Die Rekonstitution der angeborenen Immunität ist von entscheidender Bedeutung insbesondere in der Frühphase nach Transplantation. Es zeigte sich zum einen die schnelle Erholung der Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten. Ebenso ergab sich eine rasche Wiederherstellung der Phagozytosefähigkeit sowohl von neutrophilen Granulozyten als auch von Monozyten.

Allerdings gibt es noch erhebliche funktionelle Defekte bei der intrazellulären sauerstoffabhängigen Abwehr von eindringenden Erregern während der ersten zwei Monate nach Transplantation. Die funktionelle Rekonstitution der neutrophilen Granulozyten und Monozyten zur Ausführung des „oxidativen Burst“ ist in den ersten drei Monaten post transplantationem stimulusabhängig verringert. Bis zum Tag +90 aber zeigt sich auch hier eine vollständige Rekonstitution.

Hohe Zellzahlen an CD14+CD16+ Monozyten scheinen das Risiko der Entwicklung einer schweren chronischen GvHD zu reduzieren und somit indirekt die Lebensqualität des Patienten positiv beeinflussen zu können. Hierzu sollten umfassende, prospektive Studien zur Überprüfung dieses Ergebnisses durchgeführt werden. Ein daraus resultierendes besseres Verständnis für die Entstehung der chronischen GvHD könnte für die Langzeitprognose und Lebensqualität der betroffenen Patienten von großem Nutzen sein.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

Ancuta P, Weiss L, Haeffner-Cavaillon N (2000) CD14+CD16++ cells derived in vitro from peripheral blood monocytes exhibit phenotypic and functional dendritic cell-like characteristics. *Eur J Immunol* 30:1872-1883

Appelbaum FR (2004) Use of granulocyte colony-stimulating factor following hematopoietic cell transplantation: does haste make waste. *J Clin Oncol* 22:390-391

Belge KU, Dayyani F, Horelt A., Siedlar M., Frankenberger M., Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L (2002) The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168:3536–3542

Bensinger WI, Clift R, Martin P, Appelbaum FR, Demirer T, Gooley T, Lilleby K, Rowley S, Sanders J, Storb R, Buckner CD (1996) Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood*: 88:2794-2800

Bleakley M, Riddell SR (2004) Molecules and mechanism of the graft versus leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* 4:371-380

Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA (1996) Cytomegalievirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized-blind study. *Blood* 88:4063-4071

Bogunia-Kubik K, Mlynarczewska A, Jaskula E, Lange A (2006) The presence of IFNG 3/3 genotype in the recipient associates with increased risk for Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Brit J Haematol* 132:326-332

Burmester GR, Pezzutto A (2003) *Color Atlas of Immunology*, Thieme Verlag: 36-64

Burnstein CG, Weisdorf DJ, De For T, Barker JN, Tolar J, van Burik JA, Wagner JE (2006) Marked increase risk of Epstein-Barr-Virus-related complications with the

addition of antithymocyte globulin to a nonmyeloablative conditioning prior to unrelated umbilical cord blood transplantation. *Blood* 108:2874-2880

Cutler C, Li S, Ho VT, Koreth J, Alyea E, Soiffer RJ, Antin JH (2006) Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using Sirolimus and Tacrolimus in related and unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 109:3108-3114

Dammacco F, Miglietta A, Ventura MT, Bonomo L (1982) Defective monocyte chemotactic responsiveness in patients with multiple myeloma and benign monoclonal gammopathy. *Clin Exp Immunol* 47:481-6

Dayyani F, Joeinig A, Ziegler-Heitbrock L, Schmidmaier R, Straka C, Emmerich B, Meinhardt G (2004) Autologous stem-cell transplantation restores the functional properties of CD14+CD16+ monocytes in patients with myeloma and lymphoma. *J Leukoc Biol* 75:207-213

Delves PJ, Roitt IM (2000) The immune system. *N Engl J Med* 343:37-49

Dekker A, Buley S, Beyene J, Dupuis LL, Doyle JJ, Sung L, Smith TJ (2006) Meta-analysis of randomized controlled trials of prophylactic granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after autologous and allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Oncol* 24:5207-5215

Diacovich L, Gorvel JP (2010) Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* 8:117-128

Einsele H, Bertz H, Beyer J, Kiehl MG, Runde V, Kolb HJ, Holler E, Beck R, Schwertfeger R, Schumacher U, Hebart H, Martin H, Kienast J, Ullmann AJ, Maschmeyer G, Krüger W, Link H, Schmidt CA, Oettle H, Klingebiel T (2001) Arbeitsgemeinschaft Infektionen der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie. Epidemiology and interventional treatment strategies of infectious complications after allogeneic stem-cell transplantation. *Dtsch Med. Wochenschr.* 126:1278-84

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ (2005) National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:945-956

Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW (1998) Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol* 112:501-506

Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW (1988) Abnormal blood monocytes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res* 48:4812-6

Flomberg N, Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz A, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrandt W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D (2004) Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104:1923-1930

George B, Pati N, Gilroy N, Ratnamohan M, Huang G, Kerridge I, Hertzberg M, Gottlieb D, Bradstock K (2010) Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis* 12:322-329

Germing U, Hagenström H (2005) Kapitel: Hämatologie In: Gerd Herold und Mitarbeiter, Innere Medizin, Seite 78-79 und Seite 45-47

Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Riss J, Ham I, Stevens K, Burnett A, Goldstone A (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial: The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92:2322-2333

Hill GR, Ferrara JL (2000) The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in

allogeneic bone marrow transplantation. Blood 95:2754-2759

Hübl W, Wolfbauer G, Andert S, Thum G, Streicher J, Hübner C, Lapin A, Bayer PM (1997) Toward a new reference method for the leukocyte five- part differential. Cytometry 30:72-84

Hurley C, Baxter-Lowe LA, Davies S, Logan B, Karanes C, Anasetti C, Weisdorf D, Confer D (2003). National Marrow Donor Program HLA matching guidelines for unrelated marrow transplants. Biology of Blood and Marrow Transplantation 9:610-615

Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. Science 327:291-295

Kasper C, Sayer HG, Mügge LO, Schilling K, Scholl S, Issa MC, Höffken K (2004) Combined standard graft- versus- host (GvHD) prophylaxis with mycophenolate Mofetil (MMF) in allogeneic peripheral blood stem cell transplantation from unrelated donors. Bone Marrow Transplant 33:65-69

Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H (2002) CD14+CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 46:2578-86

Kobayashi SD, DeLeo FR (2009) Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 1:309-333

Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V, Weisdorf D, Confer DL (2001) Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. Blood 98:2041-2051

Krause SW, Rothe G, Gnad M, Reichle A, Andreesen R (2003) Blood leukocyte subsets and cytokine profile after autologous peripheral blood stem cell transplantation. Ann Haematol 82:628-636

Krumholz W, Stubbe K, Szalay G (2002) Der Einfluss verschiedener in der Intensivmedizin adjuvant eingesetzter Medikamente auf Monozyten-Chemotaxis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzth* 37:463-467

Langermans JAM, Hazebos WLW, van Furth R (1994) Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. *J Immunol Meth* 174:185-194

Lee SJ (2005) New approaches for preventing and treatment of chronic graft-versus-host disease. *Blood* 105:4200-4206

Lee WJ, Deeg HJ (2008) Prevention of chronic GvHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 21:259-270

Mainwaring CJ, Williams MA, Singer CR, Lush RJ, Smith JG, Haynes CL, Kelsey SM (1999) Monocyte dysfunction in patients with multiple myeloma and lymphoplasmacytic disorders is related to serum paraprotein levels. *Br J Haematol* 105:948-54

Marlies Michel (2005) *Hämatologie Basics*, Elsevier Urban&Fischer, Seite 118-119

Mattson J (2008) Recent progress in allogeneic stem cell transplantation. *Curr opin mol therap* 10:343-349

Miklos DB, Kim HT, Miller KH, Guo L, Zorn E, Lee SJ, Hochberg EP, Wu CJ, Alyea EP, Cutler C, Ho V, Soiffer RS, Antin JH, Ritz J (2005) Antibody responses to H-Y minor histokompatibility antigens correlate with chronic graft versus host disease and disease remission. *Blood* 105:2973-2978

Miyagawa B, Klingemann HG (1997) Phagocytosis and burst activity of granulocytes and monocytes after stem cell transplantation. *J Lab Clin Med* 129:634-637

Müller J, Müller-Hermelink HK (2004) Entzündung. Kap. 6:147-158 In: Rossner A, Pfeiffer U, Müller-Hermelink HK (Hrsg.) *Grundmann, Einführung in die allgemeine Pathologie*, Urban und Fischer Verlag, München

Mutrata M, Warren EH, Riddell SR (2003) A human minor histocompatibility antigen resulting from differential expression due to a gene deletion. *J Exp Med* 197:1279-1289

Neumann J (2008). *Immunbiologie*. Springer- Verlag, Seite 24-25

Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H (1996) Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88:2775-2779

Ottinger HD, Müller CR, Goldmann Sf, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Caspar J, Ebell W, Ehringer G, German T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper A, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Müller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schröder S, Schulze-Roth R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR, Grosse-Wilde H (2001) Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol.* 80:706-714

Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HWL (1989) Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74:2527-2534

Przepiorka D, Weisdorf D, Martin P, Klingemann HG, Beatty P, Hows J, Thomas ED (1995) 1994 Consensus conference on acute GvHD grading. *Bone Marrow Transplant* 15:825-828

Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. Erarbeitet vom wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes (1997) *Dt Ärzteblatt* 94:1587-1592

Roberts MM, To LB, Gillis D, Mundy J, Rawling C, Ng K, Juttner CA (1993) Immune reconstitution following peripheral blood stem cell transplantation, autologous bone marrow transplantation and allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 12:469-475

Roith IM (2001) Leitfaden der Immunologie (6. Auflage) Blackwell Wissenschaftsverlag Berlin

Rommeley M, Spies-Weisschart B, Schilling K, Hochhaus A, Sayer HG, Scholl S (2011) Reconstitution and functional analyses of neutrophils and distinct subsets of monocytes after allogeneic stem cell transplantation. J Cancer Res Clin Oncol 2011 Jun 29. [Epub ahead of print]; DOI 10.1007/s00432-011-0989-X

Sakoda Y, Hashimoto D, Asakura S, Takeuchi K, Harada M, Tanimoto M, Teshima T (2007) Donor- derived thymic- dependent T cells cause chronic graft- versus- host diseases. Blood 109:1756-1764

Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH (1995) CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colonystimulating factor. Blood 85:2910-2917

Scholl S, Hanke M, Höffken K, Sayer HG (2007) Distinct reconstitution of neutrophil functions after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. J Cancer Res Clin Oncol 133:411-415

Schubert GE, Bethke BA (1981) Lehrbuch der Pathologie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin New York

Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kaelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldar A, Or R (1998) Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and non-malignant hematologic diseases. Blood 91:756-763

Shlomchik WD (2007) Graft-versus-host disease. Nat Rev Immunol 7:340-352

Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH, Ozer H, Armitage JO, Balducci L, Bennett CL, Cantor SB, Crawford J, Cross SJ, Demetri G, Desch CE, Pizzo PA, Schiffer CA,

Schwartzberg L, Somerfield MR, Somlo G, Wade JC, Wade JL, Winn RJ, Wozniak AJ, Wolff AC (2006) 2006 update of recommendations for use of white blood cell growth factors: an evidence- based clinical practice guideline

J Clin Oncol 24:3187-3205

Sperber K (1994) Mononuclear phagocytic cells, in: Sigal LH, Ron Y Immunology and Inflammation- Basic mechanisms and clinical consequences. McGraw- Hill Verlag, New York London Tokyo Seiten: 319-335

Steer CB, Szer J, Sasadeusz J, Matthews JP, Beresford JA, Grigg A (2000) Varicella- zoster infection after allogeneic bone marrow transplantation: incidence, risk factors and prevention with low- dose acyclovir and ganciclovir. Bone Marrow Transplant 25:657-664

Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, Appelbaum F, Badger C, Bearman S, Erickson K, Flowers M, Hansen J, Loughran T et al. (1991) Chronic graft-versus-host-disease and other late complications of bone marrow transplantation. Semin in Hematol 28:250-259

Svegliati S, Olivieri A, Campalli N, Luchetti M, Poloni A, Trapolini S, Moroncini G, Bacigalupo A, Leoni P, Avvenimento EV, Gabrielli A (2007) Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. Blood 110:237-241

Teshima T, Reddy P, Liu C, Williams D, Cocke KR, Ferrara SL (2003) Impaired thymic negative selection causes autoimmune graft-versus-host disease. Blood 102: 429-435

Toubai T, Sun Y, Reddy P (2008) GVHD pathophysiology: is acute different from chronic. Best Pract Res Clin Haematol 21:101-117

Travnik R, Beckers M, Wolff D, Holler E, Landthaler M, Karrer S (2011) Graft-versus-Host Disease (GvHD)-ein Update Teil2: Prognose und Therapie. Hautarzt 62:139-155

Van den Broek PJ, van den Meer JW, Leijh PC, Zwaan F, van den Barselaar M, van Furth R (1981) Functions of granulocytes after allogeneic bone marrow transplantation. *Blut* 42:253-257

Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44-49

Volk J, Kleine HD, Buthmann U, Freund M (2000) Oxidative burst measurement in patients treated with cytostatics. Influence of G-CSF and role as prognostic factor. *Ann Haematol* 79:187-197

Wingard J, Carter S, Walsh TJ, Kurtzberg J, Small TN, Baden LR, Gersten ID, Mendizabal AM, Leather HL, Confer DL, Maziarz RT, Stadtmauer EA, Bolanos-Meade J, Brown J, Dipersion JF, Boeckh M, Korr KA (2010) Blood and Marrow Transplantation Clinical Trials Network: Results of a randomized, double blind trial of fluconazole vs. voriconazole for prevention of invasive fungal infections after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 116:5111-5118

Yona S, Jung S (2010) Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol* 17:53-59

Young Jo-Anne H (2008) Infectious complications of acute and chronic GvHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 21:343-356

Ziegler-Heitbrock HWL, Fingerle G, Ströbel M, Schraut W, Stelzer F, Schütt C, Passlick B, Pforte A (1993) The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes exhibits features of tissue macrophages. *Eur J Immunol* 23:2053-2058

Ziegler-Heitbrock HWL (1996) Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14⁺CD16⁺ subpopulation. *Immunol Today* 17:424-428

8 Anhang

8.1 Danksagung

Danken möchte ich Professor Dr. med. Klaus Höffken, Professor Dr. med. Andreas Hochhaus und Privatdozent Dr. med. Herbert Sayer für die Ermöglichung und Begleitung dieser Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. med. Sebastian Scholl gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses Themas, die umfassende Unterstützung während der experimentellen Arbeiten im hämatologischen / onkologischen Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II und die geduldige kompetente Betreuung bei der Erstellung des Manuskripts meiner Promotion.

Insbesondere möchte ich den Co-Autoren der Publikation danken. Frau Dr. rer. nat Bärbel Spieß-Weißhaupt, die mich bei den durchflußzytometrischen Analysen und der Manuskripterstellung unterstützte. In der ambulanten Patientenbetreuung gilt mein Dank Frau Dr. med. Kristina Schilling. Sie half mir sowohl bei der Erfassung der Patientendaten als auch bei der endgültigen Manuskriptdurchsicht. Professor Dr. med. Andreas Hochhaus möchte ich für seine Zuarbeit bei der Manuskripterstellung und -durchsicht danken. Für die Erarbeitung der Projektkonzeption und Manuskripterstellung geht mein Dank an Privatdozent Dr. med. Herbert Sayer. Vor allem danke ich Privatdozent Dr. med. Sebastian Scholl, der die Idee für dieses Projekt hatte und mich bei inhaltlichen Fragen, bei den experimentellen Arbeiten und bei der Manuskripterstellung betreute.

Den Mitarbeitern des hämatologischen / onkologischen Forschungslabors, der Mildred Scheel Station und der KMT-Poliklinik des Universitätsklinikums Jena, möchte ich für ihre größeren und kleineren Hilfestellungen während des experimentellen Arbeitens danken.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Jan Rommeley und Frau Monika Viefeld für das begleitende Beraten dieser Arbeit.

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

- dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität zu Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: PD Dr. med. Sebastian Scholl, Klinik für Innere Medizin II,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen zu haben,
- dass Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 04.07.2011

Maraike Rommeley

8.3 Tabellarischer Lebenslauf

I. Persönliche Daten

Maraike Tatjana Simone Rommeley, geb. Hanke

geboren am 25. Januar 1982, in Stuttgart

Familienstand: verheiratet, 3 Kinder (geb. April 2004, Juli 2008, Mai 2011)

II. Schulausbildung

1988 – 1991	Justinus-Kerner Grundschule Böblingen
1991 – 1991	König Otto Grundschule Königsbrunn
1992 – 1996	Gymnasium Maria Stern Augsburg
1996 – 2001	Werner-Heisenberg Gymnasium Göppingen
06/2001	Abitur

III. Medizinstudium

2001– 2008	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
03/2004	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02/2006- 01/2007	Praktisches Jahr an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Innere Medizin: Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie Pädiatrie: Abteilung für Hämatologie / Onkologie und Neonatologie Chirurgie: Klinik für Unfallchirurgie
06/2008	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

IV. Facharztausbildung

Ab 01/2010	Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin, Robert-Koch-Krankenhaus, Apolda
------------	--

Jena, 04.07.2011

Maraike Rommeley